

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Untersuchung der T-Zell-Antwort nach photodynamischer Therapie von
Glioblastomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
aus der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Gabriele Erna Strauß
aus
Wallkofen
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. Dr. Simone Kreth

Mitberichterstatler: PD Dr. Karim-Maximilian Niyazi
PD Dr. Nathalie Albert
Prof. Dr. Rainer Glaß
Prof. Dr. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2019

1 INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | EINLEITUNG | 6 |
| 2.1 | DAS GLIOBLASTOMA MULTIFORME | 6 |
| 2.1.1 | Epidemiologie | 6 |
| 2.1.2 | Pathologie | 6 |
| 2.1.3 | Molekularbiologie | 7 |
| 2.1.4 | Klinik und Diagnostik | 7 |
| 2.1.5 | Therapieoptionen | 8 |
| 2.2 | DIE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE | 10 |
| 2.2.1 | Geschichte und Entwicklung | 10 |
| 2.2.2 | Physikalischer und molekularbiologischer Hintergrund | 10 |
| 2.2.3 | Eingesetzte photosensibilisierende Substanzen und Lichtquellen | 11 |
| 2.2.4 | Einsatzgebiet der 5-ALA- PDT | 13 |
| 2.2.5 | Inflammation und Immunantwort nach Photodynamischer Therapie | 14 |
| 2.2.6 | T-Zell-Subpopulationen und die Rolle des adaptiven Immunsystems bei der PDT | 15 |
| 2.2.7 | Spezifische Effekte eines Glioblastoms auf das adaptive Immunsystem | 16 |
| 2.3 | FRAGESTELLUNG | 18 |
| 3 | MATERIAL | 19 |
| 3.1 | GERÄTE | 19 |
| 3.2 | VERBRAUCHSMATERIAL | 20 |
| 3.3 | CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN | 21 |
| 3.4 | SOFTWARE | 25 |
| 4 | METHODEN | 26 |
| 4.1 | ZELLKULTUR VON U87-ZELLEN | 26 |
| 4.1.1 | Auftauen von Zellen | 26 |
| 4.1.2 | Zellsplitting | 26 |
| 4.1.3 | Kryokonservierung: | 26 |
| 4.2 | INKUBATION MIT 5-AMINOLÄVULINSÄURE | 27 |
| 4.3 | PHOTODYNAMISCHE BEHANDLUNG IN VITRO | 27 |
| 4.4 | MESSUNG DER ZELLVIABILITÄT NACH PHOTODYNAMISCHER THERAPIE IN VITRO VIA CELL TITER® BLUE ASSAY | 29 |
| 4.5 | ISOLATION VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN (PBMC) | 29 |
| 4.6 | T-ZELL-ISOLATION | 30 |
| 4.7 | COKULTUR VON U87 MIT PBMC BZW. T-ZELLEN | 32 |
| 4.8 | KULTUR VON T-ZELLEN IM U87- ÜBERSTAND | 32 |
| 4.9 | DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.9.1 | Zelltod- Analyse an U87-Zellen | 33 |
| 4.9.2 | Durchflusszytometrische Analysen von Aktivierungsmarkern an der Oberfläche von T-Zellen nach Cokultur mit PDT behandelten und unbehandelten U87 | 33 |
| 4.10 | QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION | 35 |
| 4.10.1 | RNA-Isolation | 35 |
| 4.10.2 | cDNA-Synthese | 35 |
| 4.10.3 | Quantitative Real-Time PCR | 36 |
| 4.11 | FUNKTIONSASSAYS | 37 |
| 4.11.1 | Elispot (Enzyme Linked Immuno Spot)-Assay zur Quantifizierung Perforin-sezernierender CD8-positiver T-Zellen | 37 |
| 4.11.2 | Calcein- Acetoxymethyl(AM)-Assay | 39 |
| 5 | ERGEBNISSE | 41 |
| 5.1 | ETABLIERUNG EINES MIT DER IN-VIVO-SITUATION VERGLEICHBAREN IN-VITRO-MODELLS FÜR PDT AN GLIOBLASTOMZELLEN | 41 |
| 5.1.1 | Bestimmung der optimalen 5-ALA-Konzentration | 41 |
| 5.1.2 | Bestimmung einer Lichtdosis | 42 |
| 5.1.3 | Zeitkinetik zur U87-Vitalität nach PDT | 43 |
| 5.1.4 | Zusammenfassung der Festgelegten Bedingungen für Die in-vitro-PDT | 45 |
| 5.2 | ETABLIERUNG EINES MODELLS ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT | 46 |
| 5.2.1 | Analyse von T-Zellen nach Kultivierung im 48h-Überstand von behandelten U87 | 46 |
| 5.2.2 | Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenaktivierungsmarker nach Kultur von T-Zellen im Überstand von behandelten U87 bzw. nach direktem Kontakt mit U87-Zellen | 47 |
| 5.2.3 | Analyse der Genexpression in PBMC nach Cokultur mit PDT-behandelten U87 | 48 |
| 5.2.4 | Zusammenfassung des etablierten Modells für weiterführende Untersuchungen | 49 |
| 5.2.5 | Charakterisierung der Zytolyse durch CD8-positive Zellen nach direktem Kontakt mit behandelten Tumorzellen | 50 |
| 5.2.6 | Die IL1B und IL8-RNA-Expression sinkt nach Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen | 55 |
| 5.2.7 | PDT reduziert die immunparalytische Wirkung von U87 auf T-Zellen | 56 |
| 5.2.8 | Expression des T-Zell supprimierenden Oberflächenmoleküls cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA4) | 59 |
| 6 | DISKUSSION | 60 |
| 6.1 | ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-PDT-GBM-MODELLS | 61 |
| 6.2 | ETABLIERUNG EINES IN-VITRO- PDT-GBM-IMMUNZELL-MODELLS | 63 |
| 7 | SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 66 |

| | | |
|-----------|------------------------------|-----------|
| 8 | ZUSAMMENFASSUNG | 67 |
| 9 | SUMMARY | 69 |
| 10 | ANHANG | 71 |
| 10.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 71 |
| 10.2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 74 |
| 10.3 | LITERATURVERZEICHNIS | 76 |
| 10.4 | EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | 86 |
| 10.5 | DANKSAGUNG | 87 |

2 EINLEITUNG

2.1 DAS GLIOBLASTOMA MULTIFORME

2.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Glioblastoma multiforme ist eine der aggressivsten Tumorentitäten überhaupt. Eine kurative Behandlung existiert derzeit nicht. Betroffen sind meist ältere Patienten. Der Median der Altersverteilung liegt bei ca. 58 Jahre. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Unter den hirneigenen Tumoren (den Gliomen) ist das Glioblastom der häufigste Tumor (40% aller Gliome)^{2,3}.

Die Krankheitsgeschichte vor Diagnosestellung ist in der Regel kurz (Median: 8-10 Wochen). Trotz Maximaltherapie liegt der Median der Überlebensverteilung lediglich bei 15 Monaten^{3,4}. Glioblastome treten entweder primär (de-novo Glioblastome) oder sekundär im Gefolge einer malignen Transformation ehemals niedergradiger WHO Grad II Gliome auf^{5,6}.

2.1.2 PATHOLOGIE

Pathohistologisch finden sich polymorphe polychromatische Zellkerne, Mitosen, intratumorale Nekrosen mit palisadenförmig angeordneten Tumorzellen und Gefäßproliferate. Störungen der Blut-Hirn-Schranke mit erhöhter Permeabilität im Bereich der Tumoreareale mit Neoangiogenese können zu einem mehr oder minder ausgeprägtem vasogenen Ödem führen. Gefäßneubildungen im Tumor können weiterhin mit Einblutungen assoziiert sein. Makroskopisch zeigt der Tumor eine typisch „bunte“ Schnittfläche bestehend aus Einblutungen, gelben soliden und grünlichen verflüssigten Nekrosezonen und grauen soliden Tumoranteilen. Im Einzelfall kann das Erscheinungsbild sehr unterschiedlich und variabel sein. Rasches Tumorwachstum mit begleitendem vasogenen Ödem ist die Ursache für mehr oder minder ausgeprägte raumfordernde Zeichen mit Mittellinienverlagerung und Kompression des Ventrikelsystem. Die Tumore sind meist unifokal, infiltrieren aber häufig die Mittellinie (Balkenregion) und das Ventrikelsystem (subependymales Wachstum). Ca. 10- 15% der Glioblastome sind primär multifokal^{3,7}. Glioblastome metastasieren kaum, letal für die Patienten ist meist ein lokoregionales, nicht mehr kontrollierbares Tumorwachstum, das letztlich zu einer Hirnstammkompression mit Bewusstseinsverlust führt⁴.

2.1.3 MOLEKULARBIOLOGIE

Molekulare Biomarker, die auf eine unterschiedliche Tumorgenese, unterschiedliche Prognose und unterschiedliches Ansprechen auf Chemotherapie hinweisen, haben in den letzten Jahren große Bedeutung in der Neuroonkologie gewonnen⁸. Die Entwicklung personalisierter Therapiekonzepte auf der Basis spezifischer Biomarkerkonstellationen ist charakteristischer Trend innerhalb der modernen Neuroonkologie⁵. So weist beispielsweise eine Mutation im Isocitratdehydrogenase-Gen (IDH1/2) auf ein sekundäres Glioblastom hin⁹. Eine solche Mutation findet man bei ca. 10% aller Glioblastome und geht mit einer deutlich verbesserten Prognose einher. Entsprechend hat der IDH Mutationsstatus in prognostischen Modellen des Glioblastoms große Bedeutung gewonnen. Die O6-Methylguanin-Methyl-Transferase (MGMT) entfernt als DNA-Reparaturmechanismus Alkylgruppen von Guanin und wirkt deshalb der Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika und Radiotherapie entgegen. Epigenetisches „Silencing“ durch Hypermethylierung in der MGMT-Promotor-Region verbessert die Ansprechrate auf alkylierende Substanzen dramatisch¹⁰. Einen methylierten MGMT Promotor findet man bei ca. 50 % aller Glioblastome⁵. IDH mutierte Glioblastome sind deutlich häufiger methyliert (ca. 80 %). Überlebenszeiten für methylierte und unmethylierte Glioblastome nach Chemotherapie sind hochsignifikant unterschiedlich: Während sich die Überlebenszeit für unmethylierte Tumore nur marginal verbessert hat (medianes Überleben: 12,7 Monate), liegt diese für methylierte Tumore bei mittlerweile 21,7 Monaten.¹¹ Der MGMT-Promotor Methylierungsstatus gilt derzeit als der mächtigste prädiktive und prognostische Faktor in prognostischen Modellen des Glioblastoms und sollte daher im Rahmen des diagnostischen Prozesses immer bestimmt werden.

2.1.4 KLINIK UND DIAGNOSTIK

Da der Tumor sehr schnell wächst, sind die Befunde bei der Diagnosestellung oft außerordentlich große Tumoren, häufig in eloquenten Großhirnarealen. Die Patienten stellen sich mit unterschiedlichsten Symptomen vor, welche –abhängig von der Lokalisation des Tumors- von starken Kopfschmerzen mit Übelkeit und Erbrechen über fokalneurologische Ausfälle und epileptische Anfälle bis zu Wesensveränderungen reichen können⁷. Glioblastome metastasieren kaum. Letal für die Patienten ist meist eine lokoregionale, nicht kontrollierbare Dissemination des Tumors⁴.

Diagnostisch kann das Glioblastom mittels kontrastmittelunterstützter Computertomographie oder Magnetresonanztomographie detektiert werden, in der eine girlandenförmige Aufnahme des Kontrastmittels um eine zentrale Nekrose zu sehen ist. Der Tumor imponiert heterogen und

ist meist nicht von gesundem Gewebe abgrenzbar. Oft wird der Tumor zusätzlich von einem Ödem umgeben ^{4,7}.

Häufige Symptome bei Diagnosestellung sind Kopfschmerzen, Leistungsminderung und epileptische Anfälle entweder fokal oder generalisiert. Eine für das Glioblastom typische klinische Befundkonstellation existiert nicht. Bei Tumorlokalisationen im Bereich der linken Hemisphäre können Sprachstörungen hinzukommen. Sind Mittellinienstrukturen (Balkenregion) betroffen, treten Antriebsstörungen, Orientierungsstörungen und Gedächtnisstörungen in den Vordergrund der klinischen Symptome. Bei temporaler, okzipitaler oder parietaler Tumorlokalisation können Sehstörungen mit mehr oder minder ausgeprägten Einschränkungen des Gesichtsfeldes (homonyme Quadrantenanopsien, Hemianopsie) auftreten. Die Krankheitsgeschichte ist in der Regel kurz⁷. Die Verdachtsdiagnose eines Glioblastoms ergibt sich aus der Kontrastmittel verstärkten Magnetresonanztomographie. Hier zeigt sich häufig eine randständig girlandenförmige Kontrastmittel aufnehmende Raumforderung mit unterschiedlich stark ausgeprägtem perifokalen Ödem^{4,7}. Die Verdachtsdiagnose eines Glioblastoms bedarf immer einer histologischen Sicherung mit zusätzlicher molekularer Diagnostik.

2.1.5 THERAPIEOPTIONEN

Die moderne Standardtherapie des Glioblastoms besteht in der radikalen mikrochirurgischen Tumorresektion mit nachfolgender Radiochemotherapie (konkomitante und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid)¹². Bei nicht resektablen Tumoren erfolgt eine stereotaktische Biopsie. Durch die Einführung der Radiochemotherapie konnte die Prognose der Patienten mit methylierten MGMT Status erheblich verbessert werden¹³. Für Patienten mit unmethyliertem Tumor sind die therapeutischen Möglichkeiten weiterhin beschränkt¹⁴. Die Radiotherapie wird je nach Alter und klinischem Score des Patienten risikoadaptiert durchgeführt. Bei älteren Patienten (> 70 Jahre) wird häufig eine hypofraktionierte Bestrahlung empfohlen¹⁵. Die Bestrahlung wird bei diesen Risikopatienten nur im Falle eines methylierten MGMT Promotors in Kombination mit einer Temozolomid-basierten Chemotherapie durchgeführt¹⁶.

Die günstige prognostische Wirkung der Resektion scheint nur gegeben, wenn es gelingt den Kontrastmittel aufnehmenden Tumoranteil zu entfernen (sogenannte Komplettresektion). Das ist aber trotz fluoreszenzgesteuerter Resektionsverfahren¹⁷ nur bei 40-50% aller Glioblastompatienten möglich. Inkomplette Resektionen bieten gegenüber einer alleinigen Biopsie kaum messbare Vorteile, so dass auf diese häufig verzichtet werden kann^{14,18,19}. Da mittlerweile klar geworden ist, dass lokale therapeutische Maßnahmen nur sehr begrenzte

Einleitung

therapeutische Wirkungen beim Glioblastom erzielen können, treten zunehmend mit dem Tumor oder der Therapie assoziierte oder induzierte immunologische Prozesse in den Vordergrund des Interesses, um über diese effektivere Behandlungsstrategien für Glioblastompatienten zu entwickeln²⁰⁻²².

2.2 DIE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

2.2.1 GESCHICHTE UND ENTWICKLUNG

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Wirkung von Licht in Kombination mit Substanzen, die zuvor auf unterschiedliche Weise appliziert worden waren, entdeckt. Es zeigte sich, dass diese Substanzen durch Licht angeregt werden können und in Folge eine Sauerstoff-abhängige Reaktion zustande kommt. Es werden OH-Radikale als auch Singlett-Sauerstoffmoleküle in der Zelle erzeugt, die den Niedergang der Zellen einleiten ²³.

Zwischen 1950 und 1960 erkannte man den Wert des fluoreszierenden Effekts für die Diagnostik von Tumoren bzw. für die Bestimmung der Resektionsränder und im weiteren Verlauf um 1970 wurde die Photodynamische Therapie (PDT) für Tumoren durch Dougherty weiter etabliert ²⁴.

Im Laufe der Zeit entwickelte sich die Photodynamische Therapie v.a. als Alternative in der Behandlung von Hauterkrankungen, wie z. B. der aktinischen Keratose ²⁵.

2.2.2 PHYSIKALISCHER UND MOLEKULARBIOLOGISCHER HINTERGRUND

Für die PDT werden Photosensibilisatoren eingesetzt, die durch Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge in einen angeregten Zustand (S1-Zustand) übergehen, wie in Abb.1 in einem Jablonski-Diagramm dargestellt ist. In diesem angeregten Energie-Niveau sind die Photosensibilisatoren reaktiver und instabil. Ein Übergang in den etwas stabileren Triplett-Zustand (T1-Zustand) ist möglich.

Um aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand zurückzukehren, gibt es für diese Moleküle drei Möglichkeiten: Die Energie kann durch Abgabe von Strahlung (Phosphoreszenz) erfolgen. Für die PDT sind jedoch die direkten Energietransfers per Typ 1 und 2-Reaktion ausschlaggebend. Dabei kann einerseits die Energie über Elektronen- oder Iontentransfer und auf andere Moleküle übergehen (Typ 1 Reaktion (Radikalbildung)), andererseits kann ein Energietransfer auf Sauerstoff stattfinden (Typ 2 Reaktion). Hierbei wird wiederum das Sauerstoffmolekül aus dem stabilen Grundzustand in den reaktiven Singlett-Zustand überführt und damit sein energetisches Niveau angehoben. Die so generierten „Reactive oxygen species (ROS)“ können - entsprechend ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle - den verschiedenen Molekülen und Organellen Schaden zufügen. Die Reichweite solcher Reaktionszentren wird von der Lebensdauer der ROS bestimmt. Die Typ 1-Reaktion ist insofern komplexer, als dass die entstehenden Radikale u.a. über Sauerstoffperoxid eine Schädigung der Zellbestandteile

herbeiführen^{23,24,26-28}. Dieser prinzipielle Mechanismus führt die Zellen in den Zelltod, wobei sowohl Apoptose- durch Freisetzung proapoptotischer Signalstoffe und Caspasen, Nekrose – durch Schädigung der Zellwand oder der Mitochondrienmembran und massiver Freisetzung von Calcium, als auch Autophagie – durch die Aktivierung lysosomaler Signalwege- ausgelöst werden können. Es wird vermutet, dass das Verhältnis von Apoptose und Nekrose sowohl vom Photosensibilisator als auch von den Bedingungen der durchgeführten PDT abhängt^{23,29}. Zusätzlich gibt es Hinweise und Studienergebnisse für spezielle Photosensibilisatoren, die die Induktion von Blutgefäßschädigungen im Tumorgebiet aufweisen, was zu einer Hypoxie im Tumorgewebe führen würde²³.

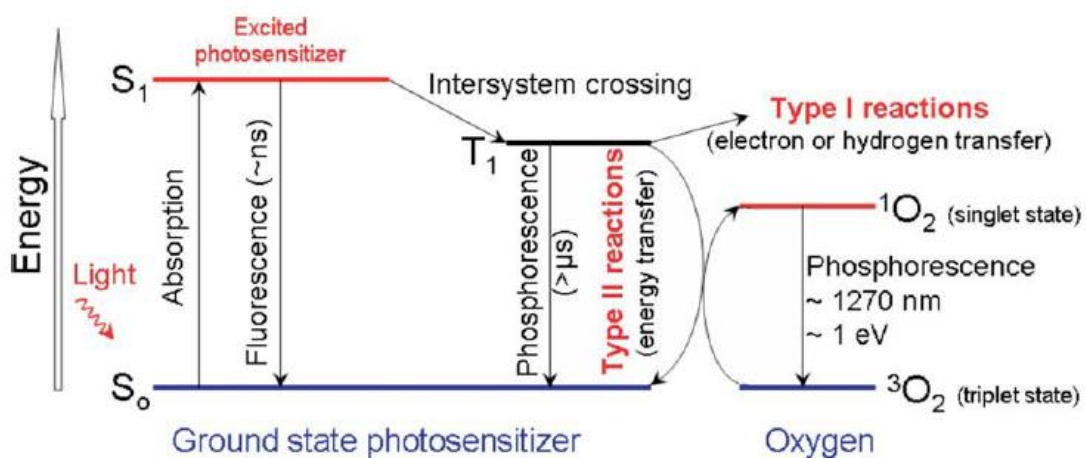


Abb. 1 Übersicht über den physikalischen Mechanismus der PDT²³. Durch die Beleuchtung mit Laserlicht wird der Photosensibilisator aus dem S₀ in den S₁-Zustand gehoben. Aufgrund der entstandenen Instabilität wird Energie in Form von Elektronen (Typ 1-Reaktion) oder in Form von Photonen (Typ 2-Reaktion) auf Sauerstoffmoleküle übertragen, wodurch ROS entstehen.

2.2.3 EINGESETZTE PHOTOSENSIBILISIERENDE SUBSTANZEN UND LICHTQUELLEN

Die bei der PDT eingesetzten Photosensibilisatoren müssen einige Bedingungen erfüllen. Es muss gewährleistet sein, dass ein relativ hoher Anteil an ROS entsteht; weiterhin ist eine hohe Stabilität erforderlich sowie niedrige bis fehlende Dunkeltoxizität. Es sollen keine toxischen Nebenprodukte entstehen und der angewandte Stoff per se sollte bei der Applikation weder Schmerzen noch andere Schäden verursachen. Er sollte zudem eine selektive Anreicherung im Zielgewebe ermöglichen. Ein hoher Konzentrationsunterschied zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe sollte möglichst geringe Nebenwirkungen in gesundem Gewebe hervorrufen. Dies ist abhängig von Applikation, Metabolisierung und Elimination des Photosensibilisators sowie der Tumorentität.

Einleitung

Als Photosensibilisator befinden sich Hämatoporphyrin-Derivate (z.B. Photofrin®), Chlorin-Derivate (z.B. Talaporfin®, FOSCAN®) und diverse Protoporphyrin-Vorstufen, wie z.B. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (z.B. Gliolan®, Metvix®) in der klinischen Anwendung ¹⁹.

Für die PDT bei Glioblastomen werden derzeit die 5-Aminolävulinsäure (Gliolan®) und meta-tetrahydroxyphenylchlorin (FOSCAN®) untersucht ²⁶.

Bei der interstitiellen PDT beim Glioblastom mit 5-ALA wird den Patienten diese Substanz oral ca. 3 Stunden vor Beginn der anästhesiologischen Vorbereitungen zum stereotaktischen Verfahren verabreicht ³⁰.

Die Substanz ist eine Vorstufe des eigentlichen Photosensibilisators, die im Zuge des Hämoprotein-Metabolismus in der Zelle zu Protoporphyrin IX umgewandelt wird. Die weitere Verstoffwechslung wird durch die Enzymkinetik der Ferrochelatase limitiert, sodass es zu einer Akkumulation von PPIX in der Zelle kommt. Die Halbwertszeit von PPIX ist viel kürzer als bei den meisten anderen Photosensibilisatoren; eine erhöhte Phototoxizität besteht nur für ca. 24-72h. Auch die sonstigen unerwünschten Wirkungen sind relativ gering ^{31,32}. Mechanismen zur Modulation des photodynamischen Effekts in Form einer erhöhten PPIX-Produktion durch die Gabe von z. B. Vitamin D über Verstärkung der Expression der Enzyme im Hämzyklus konnten gezeigt werden ³³.

Das Absorptionsspektrum von PPIX ist in Abb.2 dargestellt und zeigt ein Anregungsmaximum (Soretbande) um 400 nm sowie vier sogenannte Q-Banden. Zur Anregung der Fluoreszenz von PPIX wird das Absorptionsmaximum genutzt und mit blauem Licht angeregt. Für die PDT wird Q-Bande bei 635 nm genutzt, da rotes Licht eine hohe optische Eindringtiefe in humanes Gewebe besitzt und somit große Gewebevolumina ausgeleuchtet werden können. ^{19,23}.

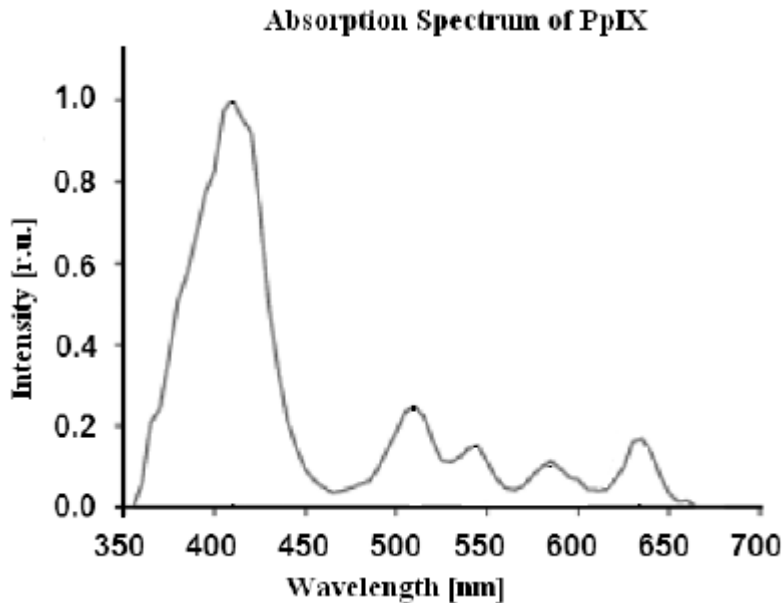


Abb. 2: Absorptionsspektrum von PPIX ³⁴ mit Soret-Bande im UV-Bereich (400 nm) und vier Q-Banden im visuellen Bereich.

2.2.4 EINSATZGEBIET DER 5-ALA- PDT

Die photodynamische Therapie unter Nutzung von 5-ALA induziertem PPIX als Photosensibilisator wurde in verschiedenen klinischen Fachbereichen getestet und kann derzeit für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Behandlung der aktinischen Keratose in der Dermatologie, bei der ein Photosensibilisator topisch angewendet werden kann, ferner werden PDT-Behandlungen von in-situ Plattenepithelkarzinomen durchgeführt ^{23,35}.

Studien zur Behandlung der cervikalen intraepithelialen Neoplasie in der Gynäkologie zeigen ebenfalls ein positives klinisches Outcome ³⁶.

Auch zur Therapie von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, wie z. B. zur Behandlung des Barrettösophagus, wurde die PDT in Studien angewendet, wobei hier die unerwünschten Wirkungen, v. a. die Bildung von Narben und Strikturen limitierend sind ^{23 37}.

Die Fluoreszenzdiagnostik auf Basis von 5-ALA induziertem PPIX bei der Harnblasenspiegelung zählt heutzutage zum Standardverfahren ^{38 39} in der Urologie und erleichtert sowohl das endoskopische Auffinden tumoröser Läsionen als auch deren Resektion mittels Radiofrequenz-Chirurgie. Die photodynamische Therapie selbst konnte sich bisher wegen des komplexen technischen Aufwands gegenüber der Bacillus Calmette-Guerin (BCG)-Therapie noch nicht durchsetzen ^{23 40}.

Grundsätzlich stehen folgende Aspekte zugunsten der Anwendung einer PDT: prinzipieller Organerhalt, Wiederholbarkeit, minimal-invasives Vorgehen, Selektivität der Wirkung, die lokale Einsetzbarkeit und geringe Nebenwirkungen².

Zur Anwendung der interstitiellen PDT bei Gehirntumoren gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen, die eine teilweise signifikante Verlängerung der Überlebenszeit zeigen²³. Beispielsweise berichteten Stummer et al. 2008 in einer Fallreportage über eine Patientin mit Glioblastom, die nach Standardtherapie an einem Rezidiv erkrankte und daraufhin mit PDT behandelt wurde. Bis zum Zeitpunkt der Publikation lag ein rezidivfreies Intervall von 56 Monaten vor³⁰. Zudem berichteten Beck et al. über die photodynamische Behandlung von Patienten mit Glioblastomrezidiv⁴¹. Im Rahmen einer Pilotstudie der Klinik für Neurochirurgie der LMU konnte nach interstitieller PDT bei de-novo-Glioblastom-Patienten bei manchen eine signifikant verlängerte Überlebensrate und ein signifikant verlängertes Progressionsfreies Überleben zeigen⁴².

Es ist dabei unklar, durch welche molekularen Mechanismen diese ungewöhnlich lange Tumorfreiheit möglich wird. Hierbei ist ein Zusammenhang mit immunologischen Faktoren wahrscheinlich.

2.2.5 INFLAMMATION UND IMMUNANTWORT NACH PHOTODYNAMISCHER THERAPIE

Die PDT führt durch Ausschüttung von Mediatoren zu einer massiven Entzündungsreaktion. Durch die PDT-spezifische Zerstörung der Zellen werden bestimmte Proteinstrukturen an die Zelloberfläche befördert, sogenannte „Damage-associated molecular patterns“ (DAMP), welche als Stimulus für das Immunsystem fungieren^{23,27,43}. Es konnte die verstärkte Expression von Hitze-Schock-Proteinen (HSP) oder Transkriptionsfaktoren, wie Nekrose-Faktor Kappa b (NF- κ b) oder Activator protein 1 (AP-1), gezeigt werden. Ausgelöst durch diese Stimuli kommt es zu einer unspezifischen Inflamationsreaktion des angeborenen Immunsystems, was sich in einer gesteigerten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren manifestiert: Anstieg von Interleukin-Sekretion (IL1 β , IL6, IL8, IL10), Tumor-Nekrose-Faktor, Chemokinen und Metalloproteinasen^{23,27,43}.

Zudem wird eine Infiltration durch neutrophile Granulozyten⁴⁴, sowie eine Aktivierung des Komplementsystems hervorgerufen^{27,45}.

2.2.6 T-ZELL-SUBPOPULATIONEN UND DIE ROLLE DES ADAPTIVEN IMMUNSYSTEMS BEI DER PDT

Das Erreichen einer langanhaltenden Tumorkontrolle von Glioblastomen nach Behandlung mit PDT lässt sich nicht mit einer unspezifischen Immunantwort allein erklären, vielmehr ist davon auszugehen, dass das adaptive Immunsystem eine wesentliche Rolle spielt ⁴⁴. Die Mechanismen, die hierzu beitragen sind, bisher jedoch kaum untersucht.

T-Zellen sind Lymphozyten, welche aus der lymphoiden Reihe der hämatopoetischen Stammzelle hervorgehen. Die T-Zellen differenzieren im Thymus und werden einer Selektion unterzogen. Je nach Funktionen werden sie in verschiedene Subpopulationen eingeteilt. Charakterisiert werden diese Subpopulationen durch Expression unterschiedlicher Oberflächenmolekülen und durch die von den T-Zellen produzierten Zytokinen.

Durch das Tragen von CD4- oder CD8- Antigen an der Oberfläche werden die Hauptgruppen der T-Zellen charakterisiert und können weiter unterteilt werden.

T-Helferzellen (TH-Zellen) exprimieren auf ihrer Oberfläche das CD4-Molekül und sie lassen sich aufgrund spezifischer Eigenschaften in Subpopulationen aufgliedern. TH1-Zellen lösen eine Kaskade zytolytischer Effekte aus, indem sie Interferon- ($\text{IFN}\gamma$), IL2 und Tumor-Nekrose-Faktor- α ($\text{TNF}\alpha$) produzieren und so z. B. eine Aktivierung von Makrophagen und von CD8 positiven T-Zellen auslösen.

TH2-Zellen hingegen lösen durch Produktion und Sekretion von Interleukin 4 und Interleukin 10 eine humorale Antwort aus, über die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und die Stimulation der Eosinophilen-Reifung. Zusätzlich gibt es weitere T-Helferzellfraktionen, u.a. die TH17-Zellen, welche Interleukin 17 bilden und somit mit der Auslösung einer akuten Entzündungsreaktion und der Stimulation neutrophiler Granulozyten assoziiert sind.⁴⁶ Erhöhte Sekretion von $\text{TGF}\beta$, wie es auch bei Glioblastomzellen vorkommt ^{47,48}, kann bei der Differenzierung eine tumorigene Wirkung der Th17-Zellen erzeugen⁴⁶.

Weitere CD4 positive Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg), welche eher einen immunsuppressiven Effekt haben und damit eine akute Entzündungsreaktion lokal eindämmen sowie das Entstehen einer überschießenden Immunantwort, wie z.B. das Auftreten von Autoimmunerkrankungen, Allergien oder die Induktion einer generalisierten Entzündungsreaktion bei lokalem Reiz verhindern können. Neben dieser positiven Wirkung können sie jedoch auch einen Nachteil haben, in dem sie Anti-Tumor-Immunantworten

blockieren. Kennzeichnend für diese Zellen ist u. a. eine hohe Expression von CD25 (α -Kette des IL2-Rezeptors), eine niedrige bis keine Expression von CD127 (IL7 Rezeptor) sowie eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box protein 3).

Die zweite große Gruppe von T-Zellen sind die zytolytischen T-Zellen (CTL), welche zumeist CD8-Moleküle an ihrer Oberfläche tragen. Die zytotoxische Wirkung wird durch die Sekretion von Serinproteasen (Granzyme), Perforin und Granulysin sowie durch Sekretion von IFN γ und TNF α ausgelöst. Während Perforin in der Membran Poren bildend und nekrosefördernd wirkt, können Granzyme, durch diese Poren in die Zellen eindringen und über direkte Aktivierung von Caspasen und Schädigung zellulärer Bestandteile Apoptose hervorrufen. Außerdem tragen viele Zellen Fas-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Durch Bindung des Fas-Liganden, der von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, kommt es zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose (s.Abb. 3) ^{49,50}.

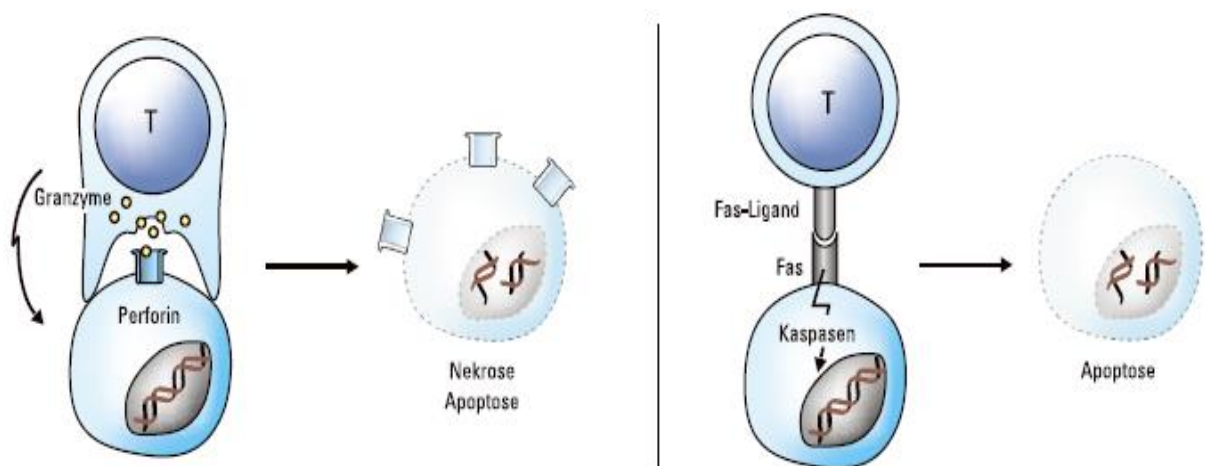


Abb. 3: Zytolytische Mechanismen der CD8 ⁵⁰. Durch Porenbildung über Perforin und Sekretion von Granzym sowie durch Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor kommt es zur Lyse der Zielzelle

2.2.7 SPEZIFISCHE EFFEKTE EINES GLIOBLASTOMS AUF DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

Die Aggressivität des Glioblastoms beruht neben dem rapiden Wachstum des Tumors auch auf immunologischen Effekten. Es ist bekannt, dass von Glioblastomen eine immunparalytische Wirkung ausgeht, sodass eine abgeschwächte Immunantwort zusätzlich zum ungebremsen Wachstum des Tumors beiträgt ⁵¹. Das Gehirn ist aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und dem eigenem Lymphabfluss vor Regulationsstörungen des Immunsystems geschützt. ⁵¹ Im Zuge des Tumorstwachstums wird v. a. die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen und der Schutzmechanismus aufgehoben. Immunzellen finden dadurch den Weg in den Tumor. Durch die immunsuppressive

Einleitung

Wirkung des Glioblastoms und der Glioblastomumgebung wird ein adäquater antitumorigener Effekt verhindert ⁵². Die Infiltration des Tumors mit sowohl mit regulatorischen T-Zellen, als auch mit M2 Makrophagen und MDSCs ist beschrieben ^{53,54}. Außerdem ist bekannt, dass in der Tumorumgebung eine vermehrte Expression von PD-1L (programmed cell death -1 Ligand) und CTLA4 besteht und es damit zu einer erhöhten Apoptoserate und einer Inhibierung der T-Zell-Aktivität kommt ⁵². Die Untersuchung von Gliompräparaten zeigte, dass die Anzahl der tumorständigen CD4 positiver T-Zellen positiv mit dem Tumorgrad, die Anzahl der CD8-positiven Zellen negativ mit dem Tumorgrad und auch der Überlebensrate korreliert ⁵⁵.

Es gibt außerdem Hinweise auf eine systemische Immunsuppression. Morford et al. beschrieben im peripheren Blut von Glioblastom-Patienten eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate aktivierter T-Zellen, welcher eine von Glioblastomzellen induzierte Mediatorenausschüttung aus Monozyten zugrunde liegt ⁵⁶. Des Weiteren ist der Anteil regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut erhöht ⁵².

2.3 FRAGESTELLUNG

Bei einer von der Klinik der Neurochirurgie der LMU durchgeführten Pilotstudie wurden Glioblastom-Patienten, welche für eine offene chirurgische Resektion nicht in Frage kamen, mit stereotaktischer interstitieller PDT behandelt. Die postinterventionelle Beobachtung zeigte eine Rezidivfreiheit von 30 - 70 Monaten bei 6 der 15 behandelte Patienten. Insgesamt kam es zu einer 3-Jahresüberlebensrate von 55 % im Vergleich zu 36 % nach Resektion plus Temozolomid⁵⁷. Es ist bislang völlig unklar, wie es zu dieser langanhaltenden Tumorkontrolle kommt. Vermutet wird eine durch PDT induzierte adaptive Immunantwort, sodass ein besseres Erkennen des Tumors möglich und ein „memory effect“ eingeleitet wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun ein in-vitro Modell entwickelt werden, das die in-vivo-Situation möglichst gut nachstellen kann und weitere Untersuchungen zur Immunantwort nach PDT zulässt.

Nach Etablierung dieses Modells sollte daran die folgende Hypothese untersucht werden:

PDT führt zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit insbesondere T-Zell-spezifischen Effekten und zu einer Abschwächung der vom Glioblastom induzierten Immunparalyse.

3 MATERIAL

Folgende Materialien wurden zur Durchführung der Experimente verwendet.

3.1 GERÄTE

| | |
|----------------------------------|--|
| Brutschrank (Kendro BB6220) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Sterilbank (Hera Safe Kendro) | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Wasserbad | Julabo GmbH, Seelbach |
| Kühlschrank FKU 1800 | Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach |
| Gefrierschrank -80°C | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Stickstofftank (chronos biosafe) | Cryotherm GmbH & Co.KG, Kirchen (Sieg) |
| Zentrifugen | Eppendorf AG, Hamburg |
| Tischzentrifuge | Eppendorf AG, Hamburg |
| Laser 635 nm (Ceralas) | CeramOptec GmbH, Bonn |
| Bestrahlungskammer | LIFE-Zentrum LMU, München |
| Fieldmaster Powermeter | Coherent, Inc., USA |
| Einwaage | Sartorius AG, Göttingen |
| FLUOstar OPTIMA | BMG LABTECH GmbH, Ortenberg |
| FACS Calibur | Becton, Dickinson and Company, USA |
| LSRII | Becton, Dickinson and Company, USA |
| Blockthermostat QTB4 | Grant Instruments, UK |
| autoMACS | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |

Material

| | |
|-----------------------------------|--|
| Vortex (REAX 2000 XR) | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach |
| ViCell XR Cell Viability Analyzer | Beckman Coulter Inc., USA |
| NanoDrop | Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen |
| Lightcycler 480 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Thermocycler (Mastercycler) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Lichtmikroskop | Leica Microsystems Inc., USA |
| ImmunoSpot Analyzer | CTL Europe GmbH, Bonn |
| Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipette boy (Easypet) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Neubauer-Zählkammer | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| MACS-Midi-Magneten | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |
| MrFrosty™ Freezing Container | Thermo Scientific Inc., USA |

3.2 VERBRAUCHSMATERIAL

| | |
|---------------------------------------|--|
| 50 ml tubes | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| 15 ml tubes | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| FACS-tubes (QS845) | Alpha laboratories, Hampshire UK |
| PCR-Gefäße 0,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Safe lock tubes | Eppendorf AG, Hamburg |
| Leucosep Röhrchen | Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster |
| 75 cm ² Zellkulturflaschen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| 25 cm ² Zellkulturflaschen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |

Material

| | |
|-------------------------------------|--|
| Pipettenspitzen 0,5-20 µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen 2-200 µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen 100-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen 30-300 µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen 1000-5000 µl | Eppendorf AG, Hamburg |
| Filterspitzen 0,5-10 µl | Biozym Scientific GmbH & Co. KG |
| Filterspitzen 2-200 µl | Biozym Scientific GmbH & Co. KG |
| Serologische Pipetten 2 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Serologische Pipetten 5 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Serologische Pipetten 10 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Serologische Pipetten 25 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| LS-Säulen für MidiMacs | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach |
| RNA-Isolations- tubes | Lifetechnologies, USA |
| RNA-Isolation Filter | Lifetechnologies, USA |
| 96-Multiwell-Platten für RT-PCR | Life technologies, USA |
| multiscreen 96-Well-Filtration-Pore | Merck Millipore, USA |

3.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Zellkulturmedium:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

| | |
|---|---------------------|
| mit und ohne Phenolrot | Biochrom AG, Berlin |
| Zusätze: 10 % fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom AG, Berlin |
| 1 % Natriumpyruvat (100 mM) | Biochrom AG, Berlin |
| 1 % Minimum Essential Medium | Biochrom AG, Berlin |

Material

| | |
|--|--|
| 1 % Penicillin-Streptomycin | Biochrom AG, Berlin |
| RPMI III: | |
| RPMI 1640 | Biochrom AG, Berlin |
| +10 % humanes Serumalbumin (HSA) | Biochrom AG, Berlin |
| + 1 % Natriumpyruvat (100 mM) | Biochrom AG, Berlin |
| + 1 % L-Glutamin (200 mM) | Biochrom AG, Berlin |
| + 1 % Penicillin-Streptomycin | Biochrom AG, Berlin |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach |
| Phosphate bufferd saline (PBS) | Biochrom AG, Berlin |
| Trypsin/EDTA(10X) | Biochrom AG, Berlin |
| Biotase | Biochrom AG, Berlin |
| 5-Aminolävulinsäure-Hydrochlorid | Medac GmbH, Wedel |
| CellTiter®-Blue Cell Viability Assay | Promega GmbH, Mannheim |
| Ficoll-Paque™ Plus | GE Healthcare, UK |
| Trypanblau | Biochrom AG, Berlin |
| Calcein AM | Invitrogen, USA |
| DMSO (anhydrous) | Life-technologies, USA |
| Human Perforin ELISpot ^{PLUS} Kit | Mabtech AB, Schweden |
| rh Interleukin 2 | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |
| CD28 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| CTL Test™ Medium | CTL Europe GmbH, Bonn |
| Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 | Thermo Fisher Scientific; USA |

Material

| | |
|--|--|
| MACS BSA Stock solution | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |
| AutoMacs Rinsing Solution | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |
| CD8 Microbeads | Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach |
| cDNA-Synthese-Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| UPL-Sonden | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Lightcycler 480 Probes Master | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Real Time Ready IL8 Single Assay | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Ambion™ RNAqueous total RNA Isolation Kit | Lifetechnologies, USA |
| Dead Cell Apoptosis Kit (Annexin V FITC /PI) | Thermo Fisher Scientific; USA |
| LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit | Invitrogen, Karlsruhe |

Antikörper für Durchflusszytometrie von PBMC/T-Zellen:

| Antikörper | Konjugat | Klon | Ig-Klasse | Firma |
|------------|-----------------|---------|-------------|------------|
| CD3 | Horizon V500 | UCHT1 | IgG1k | BD |
| CD4 | APC | L200 | IgG1k | BD |
| CD8 | Alexa Fluor 700 | RPA-T8 | Mouse IgG1k | Pharmingen |
| CD25 | PerCP-Cy5.5 | M-A 251 | IgG1k | Pharmingen |
| CD69 | FITC | FN50 | Mouse IgG1k | BD |

Material

| | | | | |
|-------|------|-------|-------|----|
| CD154 | PE | 89-76 | IgG1 | BD |
| CD134 | FITC | ACT35 | IgG1 | BD |
| CD137 | PE | 4B4-1 | IgG1k | BD |
| CD152 | PE | BNI3 | IgG2a | BD |

Oligonukleotide: Die verwendeten Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

| Targets | Sequenz P _{forward} | Sequenz P _{reverse} |
|--------------|--|--|
| IL2 | 5'- AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG G- 3' | 5'- AAG TCA AAG TTT TTG CTT TGA GTA A -3' |
| IL4 | 5'- TGC CCC ACA TTG TCA CTG C -3' | 5'- GCA CAT GCT AGC AGG AAG AAC -3' |
| IFNG | 5'- GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA -3' | 5'- TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT -3' |
| TNF α | 5'-CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT-3' | 5'- GCC AGA GCG CTG ATT ACA GA -3' |
| IL17A | 5'- TGG GAA GAC CTC ATT GGT GT-3' | 5'- GGA TTT CGT GGG ATT GTG AT -3' |
| IL10 | 5'- TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA -3' | 5'- GCA ACC CAG GTA ACC ATT AAA -3' |
| ROR γ | 5'- CAG CGC TCC AAC ATC TTC T- 3' | 5'- CCA CAT CTC CCA CAT GGA C- 3' |
| Foxp3 | 5'- CCT TGC CCC ACT TAC AGG -3 | 5'- CAA CCG TTG AGA GCT GGT -3' |
| TGF β | 5'-ACT ACT ACG CCA AGG AGG TCA- 3' | 5'- TGC TTG AAC TTG TCA TAG ATT TCG- 3' |

Material

| | | |
|------|---|---------------------------------------|
| IL1B | 5'-GAG GCA CAA GGC ACA ACA G-3' | 5'- CCA TGG CTG CTT CAG ACA C- 3' |
| GZMB | 5'- GGG GGA CCC AGA GAT TAA -3' | 5'- CCa TTG TTT CGT CCA TAG -3' |
| PRF1 | 5'-CAC TCA CAG GCA GCC AAC T -3' | 5'- GGG AGT GTG TAC CAC ATG -3' |
| TBP | 5'- GAA CAT CAT GGA TCA GAA CAA CA -3' | 5'- ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT -3' |
| ACTB | 5'- CCA ACC GCG AGA AGA TGA -3' | 5'- CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG -3' |

3.4 SOFTWARE

Bestrahlungssoftware für Bestrahlungskammer: Eigenentwicklung im LFL

FACS-Messung: BD Diva

FACS-Analysen: Flow Jo Software, FlowJo LLC, Ashland, Oregon

ImmunoSpot® Software: CTL Europe GmbH, Bonn

Fluostar Optima series und Optima MARS: BMG LABTECH GmbH, Ortenberg

Statistik: Microsoft Office: Excel 2007; SigmaPlot, Systat Software GmbH 2017

4 METHODEN

4.1 ZELLKULTUR VON U87-ZELLEN

4.1.1 AUFTAUEN VON ZELLEN

Die in Kryotubes gelagerten U87-Zellen wurden unter raschem Arbeiten im Wasserbad (37°C) aufgetaut, in sterile 15 ml- Röhrchen überführt, mit Tumormedium (DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % MEM, 1 % Natriumpyruvat) versetzt und bei 1200rpm für 5 Minuten zentrifugiert, sodass das zur Kryokonservierung verwendete DMSO, das einen zytotoxischen Effekt hat, ausgewaschen werden konnte. Nach Abnahme des Überstands konnten die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt werden und entsprechende Zellzahlen berechnet werden. Zwischen 1×10^6 und 3×10^6 Zellen wurden dann in 75 cm² Gewebekulturflaschen mit ca. 10ml Medium kultiviert.

4.1.2 ZELLSPLITTING

Je nach Wachstum wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, tote Zellen mittels PBS abgespült und U87-Zellen mit Trypsin/EDTA bei zweiminütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst. Anschließend konnten sie mit Medium abgespült, nach einem Waschschrift gezählt und entsprechend der Zellzahl auf Gewebekulturflaschen verteilt werden.

Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.1.3 KRYOKONSERVIERUNG:

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen, wie oben beschrieben, von der Gewebekulturflasche gelöst und zentrifugiert. Nach der Zellzählung konnten die Zellen auf Kryotubes verteilt werden, sodass jeweils mindestens 3×10^6 Zellen in einem Röhrchen gelagert werden konnten.

Die Kryokonservierungslösung bestehend aus DMEM, FCS, DMSO im Verhältnis 1:1:0,5 wurde vorbereitet und die Zellsuspension mit identischem Volumen verdünnt. Direkt im Anschluss wurden diese in Kryokonservierungs-Tubes nach Überführung in ein Mr. Frosty Freezing Container bei -80 °C gelagert. Durch dieses spezielle Gefäß werden die Zellen in der Kryolösung durch einen mit 2-Propanol gefüllten Zwischenraum kälteisoliert und somit nur

gezielt um ein Grad pro Stunde herabgekühlt. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Zellen in die Stickstofftonne überführt.

4.2 INKUBATION MIT 5-AMINOLÄVULINSÄURE

20 000 U87- Zellen bzw. 400 000 Zellen pro Well wurden in 96- oder 6-Well-Platten in 200 µl bzw. 4000 µl Tumormedium ausgesät, die Zellzahl wurde in Vorversuchen festgelegt. Diese Platten wurden im Brutschrank für ca. 18 Stunden inkubiert. Für die Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) wurde eine Lösung aus 5-ALA in entsprechender Konzentration hergestellt. Dazu wurde 5-ALA abgewogen und mit PBS eine 1-mg/ml konzentrierte Lösung erstellt. Aufgrund des sauren pH-Werts von 5-ALA, musste dieser mittels Natronlauge (NaOH) in den neutralen Bereich titriert werden, um ein optimales Milieu für die Zellen zu schaffen. Mittels DMEM wurden die jeweils gewünschten Konzentrationen für 5-ALA hergestellt. Wie schon bekannt war, ist bei Verwendung von FCS im Medium die gemessene Protoporphyrin (PPIX)-Fluoreszenz in der Zelle geringer als bei Medium mit FCS- diese These wurde in einem Nebenversuch überprüft, für alle anderen Versuche wurde allerdings Medium ohne FCS zur Inkubation mit 5-ALA verwendet. Von der erstellten 5-ALA-Lösung wurden 200 µl bei 96-Well-Platten bzw. 4000 µl bei 6-Well-Platten je Well verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bei Dunkelheit im Brutschrank. Nach Inkubationszeit von 4 h wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Die Konzentration des Photosensibilisators wurde anhand einiger Versuchsreihen bestimmt. Hierbei wurde mittels Fluorometer bei eingestellter Anregungswellenlänge 400-10 nm und einer Emissionswellenlänge 630-10 nm die Protoporphyrin IX-Fluoreszenz gemessen und damit die Aufnahme und der Umsatz der 5-Aminolävulinsäure experimentell bestimmt.

4.3 PHOTODYNAMISCHE BEHANDLUNG IN VITRO

Die PDT besteht grundsätzlich aus zwei Komponenten. Nach der oben beschriebenen Inkubation mit Photosensitizer folgt die Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 635 nm.

Nach jeweiliger Inkubationszeit wurde das 5-ALA-enthaltende Medium abgenommen und die Wells mit farblosem DMEM ohne FCS (150 µl bei 96-Well-Platten bzw. 1500 µl bei 6-Well-Platten) befüllt. Danach wurde die PDT mit einer Bestrahlungsleistung von 100 mW/cm² (Einstellung mit Hilfe eines Leistungsmessgerätes) gestartet. Die Einstellung der Lichtdosen (in J/cm²) erfolgte über die Anpassung der Bestrahlungsdauer (Bestrahlungsleistung (mW/cm²))

Methoden

x Bestrahlungsdauer (sec) = applizierte Lichtdosis oder Lichtenergie (J/cm^2). Die Bestrahlungskammer (Knappe et al) war so aufgebaut, dass der Laser von unten auf die Platte strahlte (s. Abb.5). Der zur PDT bestimmte Bereich wurde mittels austauschbarer Blende eingegrenzt, sodass auf 6-Well-Platten jeweils ein Well bzw. auf den 96-Well-Platten eine Sechser-Gruppe gezielt erreicht werden konnte (s. Abb. 4). Alle Schritte bis zur Bestrahlung erfolgten in Dunkelheit, sodass keine unkontrollierte Anregung durch Umgebungslicht erfolgen konnte.

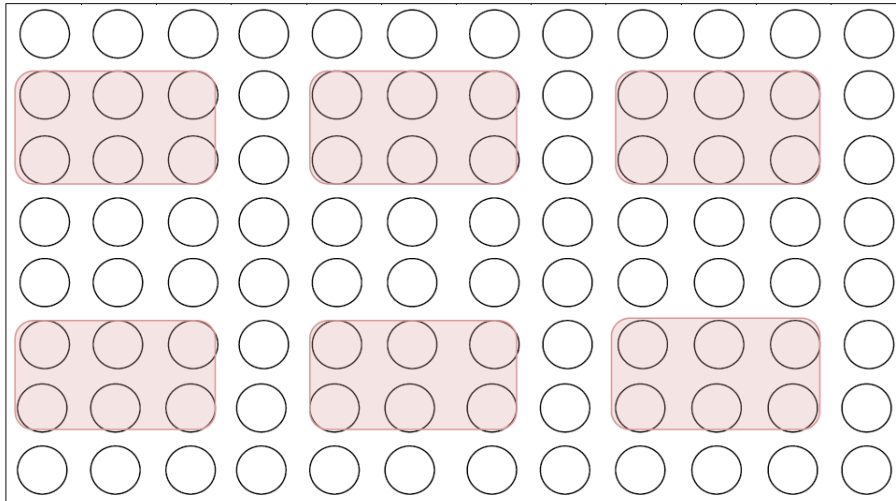


Abb. 4: Schematische Darstellung 96-Well Platte zur Bestrahlung in der Bestrahlungskammer. bestrahlte Bereiche rot markiert



Abb. 5: Bestrahlungskammer mit Laser für in-vitro PDT

4.4 MESSUNG DER ZELLVIABILITÄT NACH PHOTODYNAMISCHER THERAPIE IN VITRO VIA CELL TITER® BLUE ASSAY

Um die Stärke und Auswirkung verschiedener Bedingungen bei PDT, wie Konzentration von 5-ALA und Bestrahlungsdosen festzustellen, wurde die Zellviabilität bestimmt, um so zu quantifizieren, wie hoch der letal geschädigte Anteil der U87-Zellen durch die PDT unter jeweiligen Bedingungen ist. Nach Festlegung der Konzentration und Inkubationszeit von 5-ALA, sowie eines Bereichs der Bestrahlungsdosis wurde eine Zeitkinetik (zwischen 4 und 48 Stunden nach PDT) der Zellviabilität im angestrebten Dosisbereich erstellt. Hierfür wurden, wie oben beschrieben, Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät und mit in-vitro PDT behandelt. Unter den jeweiligen Ansätzen befand sich außerdem zum Vergleich eine 5-ALA inkubierte, unbestrahlte Kontrollgruppe sowie eine bestrahlte Kontrollgruppe, allerdings ohne vorhergehender 5-ALA-Applikation. Dadurch konnte eine Schädigung der Zellen durch die Einzelkomponenten der PDT in der Auswertung mitberücksichtigt werden.

Nach Vorschrift des CellTiter® Blue- Assays (CTB) wird 20 µl blauer Farbstoff auf 100 µl Medium gegeben. Das Reagenz besteht aus gepuffertem Resazurin, ein Stoff, der die Membran vitaler Zellen passieren kann und enzymatisch von diesen vitalen Zellen im Zellinneren zu Resorufin reduziert werden kann. Resazurin wiederum kann die Zellmembran durch Diffusion überwinden und ins umgebende Medium abgegeben werden. Im Gegensatz zu Resazurin fluoresziert Resorufin. Diese Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Viabilität der Zellen, welche somit quantifiziert und verglichen werden kann.

Nach einer einstündigen Inkubation mit CTB wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt (Exzitation: 560-10nm und Emission: 590nm). Über die unbestrahlte Kontrolle, für die eine Viabilität von 100% festgelegt wurde, wurde dann die relative Letalität für die anderen Gruppen mit Therapie durch Division der absoluten Werte errechnet. Es erfolgte eine dreifache Wiederholung des Experiments und die Berechnung des Mittelwerts und des Standardfehlers.

4.5 ISOLATION VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN (PBMC)

Vorbereitend wurden Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll befüllt und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. In diesen Röhrchen ist auf Höhe der 15 ml-Volumen-Marke eine Trennscheibe aus Polyethylen angebracht. Durch die Zentrifugation wird das Ficoll unter diese Membran verlagert. Dadurch wird die Separation über den Dichtegradienten erleichtert.

PBMC wurden aus Blut von gesunden Spendern nach schon etabliertem Protokoll isoliert. Dafür wurde den Spendern je nach geplantem Versuch ein bestimmtes Volumen Vollblut in heparinisierten Röhrchen abgenommen und dieses gesammelt und mit PBS verdünnt, sodass im Anschluss je 25 ml auf ein mit Ficoll befülltes Leucosep-Röhrchen verteilt werden konnten. Die Dichtegradienten-Zentrifugation fand bei 2000 rpm für 15 Minuten ohne Bremse statt. Dadurch konnte das Blut in drei Schichten aus Erythrozyten, PBMC und Plasma aufgetrennt werden (s. Abb. 6). Die sich in der Interphase ablagernden PBMC wurden abgenommen und mehrfach mit PBS gewaschen und im Anschluss gezählt.

Je nach Versuchsplanung wurden die Zellen in Resuspensionslösung (95 % RPMI und 5% Humanserumalbumin) und in Kryokonservierungslösung (80 % HSA und 20 % DMSO) eingefroren oder standen zur Kultivierung zu Verfügung.

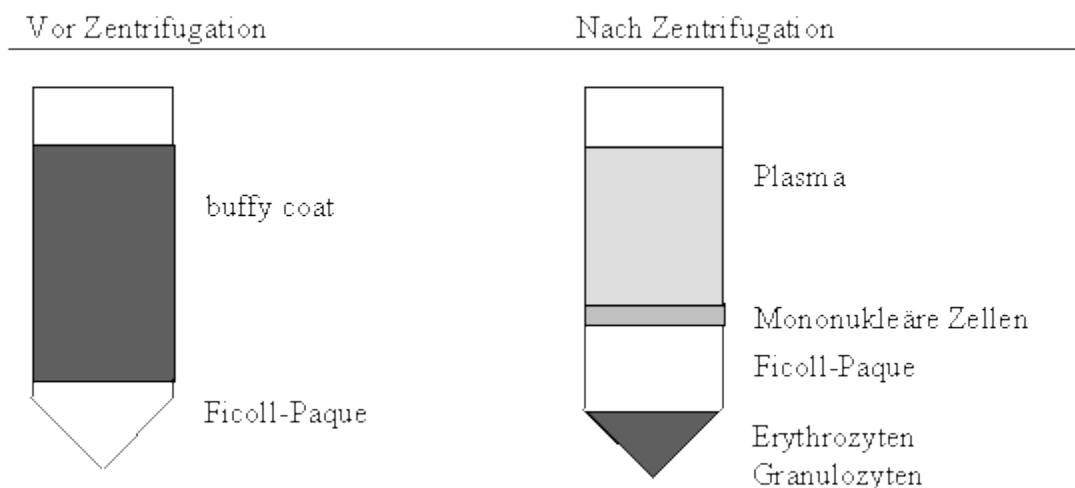


Abb. 6: Dichtegradientenzentrifugation zur Separierung von PBMC aus Vollblut⁵⁸. Durch Zentrifugation werden PBMC von Erythrozyten und Granulozyten abgetrennt.

4.6 T-ZELL-ISOLATION

Aus den isolierten PBMC wurden T-Zell-Subpopulationen nach Vorschrift mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Dabei werden Zellen mit kleinen magnetischen Partikeln durch Antigen-Antikörper-Bindung markiert. Es kommt hier aufgrund der geringen Größe weder zu Beeinflussung von Oberflächenmolekülen, noch zur Aktivierung der Zelle. Die Zellsuspension wird im Anschluss über eine Säule, welche eine Membran aus

ferromagnetischen Bestandteilen enthält und durch Positionierung in einem Magnetseparator eine Vervielfachung des magnetischen Feldes erfährt, getrennt. Positiv gelabelte Zellen bleiben in der Säule zurück, während ungelabelte Zellen aufgefangen werden (Negativselektion). Die gelabelten Zellen können durch Elution aus der Säule gewonnen werden (Positivselektion).⁵⁹

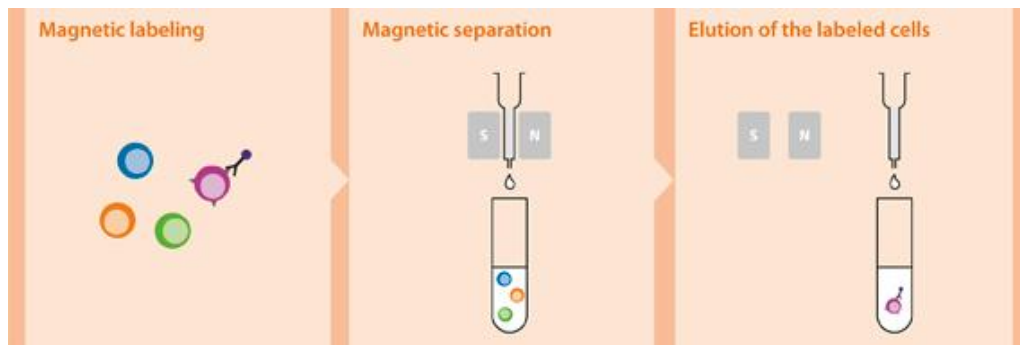


Abb. 7: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation:⁵⁹ Labeling der Zellen, Separation mit Hilfe des magnetischen Feldes, Auswaschen der Zellen

Um die Gesamt-T-Zell-Population zu erhalten, wurde ein Pan-T-Zell-Kit verwendet, welches via Negativselektion Zielzellen aus PBMC extrahiert. Hierfür sorgten an Biotin gekoppelte Antikörper gegen in PBMC vorhandene Nicht-T-Zellen (Inkubation für 10 Minuten bei 4°C). Da es sich hier um eine indirekte Extrahierung für die Zielzellen handelt, wurden im zweiten Schritt Antibiotin-Antikörper ebenso bei 4°C für 15 Minuten hinzugegeben, die gebunden an magnetische Beads das Zurückhalten im Magneten (MACS LS-Säule) in der Säule gewährleisten. (s. Abb. 7)

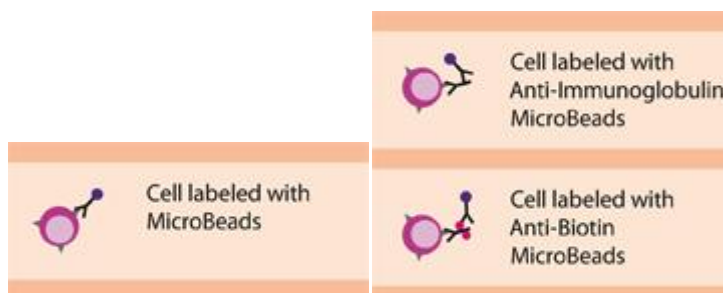


Abb. 8: Schematische Darstellung des direkten oder indirekten Labelings durch Kopplung magnetischer Beads an Primär- oder Sekundärantikörper⁵⁹

Um die CD8 –T-Zell-Fraktion zu erhalten, wurden CD8 Microbeads von Miltenyi verwendet. Aus PBMC konnten diese hier via Positivselektion gewonnen werden, indem PBMC mit CD8 Microbeads für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert wurden und nach einem Waschschrift mit Hilfe des autoMACS CD8-positive Zellen gewonnen wurden.

Durch die Verwendung des autoMACS konnten die geringe Anzahl der CD8-Zellen stabilisiert und eine höhere Reinheit erzielt werden. Die aufgetrennten Zellsuspensionen wurden in bereitgestellten Röhrchen aufgefangen. Nach Zentrifugation wurde anfangs ein Teil der Zellen für Reinheitsanalyse mittels Durchflusszytometrie verwendet und mit einem fluorochrom-konjugierten CD8-spezifischen Antikörper gefärbt.

4.7 COKULTUR VON U87 MIT PBMC BZW. T-ZELLEN

Das Vorgehen für die Cokultivierung von U87 mit PBMC bzw. PanT-Zellen war bis auf weitere Isolationsschritte zur Gewinnung von PanT-Zellen identisch.

Cokulturen wurden immer parallel für PDT-behandelte und unbehandelte U87-Zellen sowie eine reine PBMC- bzw. PanT- Kontrollgruppe angesetzt. Hierfür wurden, wie oben beschrieben, U87-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach dem Anwachsen mit PDT behandelt. Die behandelten Zellen wurden bei Anwendung unterschiedlicher Lichtdosen im Anschluss mittels Biotase enzymatisch von der Oberfläche gelöst, gezählt und die Zellen unterschiedlicher Lichtdosen in gleichen Anteilen gemischt. Ebenso wurden unbehandelte Zellen gelöst, gezählt und die gleiche Zellmenge wie insgesamt die behandelten Zellen verwendet. Dazu wurde die jeweils gleiche Menge PBMC bzw. PanT-Zellen gegeben, die zuvor –wie oben beschrieben– von gesunden Spendern gewonnen worden waren. Die Zellen wurden je nach benötigter Menge für die Weiterverarbeitung (8 Mio. PBMC für CD8-Analysen, 4Mio. PBMC für PanT-Zell-Analysen/ Ansatz) in 6-Well-Platten oder 25 cm² Zellkulturflaschen in DMEM kultiviert. Das Verhältnis von U87 zu PBMC bzw. PanT-Zellen war 1:10. Zur Stimulation wurden nach vorheriger Austestung 12,5 µl CD3/CD28-Beads/4x10⁶ PBMC bzw. PanT hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 48 h. Dann konnten die Zellen geerntet und für weitere Analysen verarbeitet werden.

4.8 KULTUR VON T-ZELLEN IM U87- ÜBERSTAND

Zur Generierung des U87-Überstands wurden U87 nach Anwachsen auf 6-Well Platten mit PDT behandelt und 24 h nach PDT der Überstand abgenommen. Zuvor isolierte T-Zellen wurden mit dem von Tumorzellen mit bzw. ohne PDT-Behandlung produzierten Stoffen im Überstand kultiviert. Hierfür wurden 1,5 Mio. PanT- Zellen pro Well einer Sechs-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Stimulation erfolgte mit 12,5 µl CD3/CD28-Beads pro 10⁶ Zellen. Die Inkubationsdauer betrug 24 h und 48 h. Als Kontrolle dienten dazu sowohl in

unbehandelten-U87-Medium kultivierte T-Zellen als auch T-Zellen ohne Kontakt zu U87-Zellen.

4.9 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

4.9.1 ZELLTOD- ANALYSE AN U87-ZELLEN

Es ist beschrieben, dass durch die PDT sowohl Apoptose als auch Nekrose ausgelöst werden^{23,60}. Im Unterschied zum lytischen Prozess durch toxische Schädigung der Zellmembran bei Nekrose ist die Apoptose ein programmierter Zelluntergang und wird durch Zellkaskaden bei Zellschädigung gestartet.

Um Effekte der PDT auf U87 festzustellen wurden die Zellen nach PDT für die Durchflusszytometrie nach Protokoll des Herstellers vorbereitet. Dazu wurden die Zellen mittels Biotase von der Oberfläche gelöst, abgenommen, zentrifugiert und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1ml/10⁶ 1x Annexin-Binding-Buffer resuspendiert und 100 µl davon separiert, welche dann in einem FACS-Röhrchen mit 5 µl Annexin-FITC und 5 µl Propidiumiodid für 15 Minuten bei 4 °C gefärbt wurden. Danach wurde 400 µl Annexin-Binding-Buffer hinzugefügt. Als Vergleichsgruppe wurden unbehandelte U87-Zellen in gleicher Weise behandelt, für beide Proben gab es zusätzlich eine ungefärbte Kontrolle zur Einstellung am Durchflusszytometer (FACS Calibur). Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist ein Farbstoff der nach Anregung mit blauem Licht sein Emissionsmaximum bei 530 nm hat, während Propidiumiodid bei einer Wellenlänge von 590 nm maximale Emission hat. Hintergrund dieser Färbung ist, dass Annexin an Phosphatidylserin bindet, welches bei apoptotischen Zellen aus der Membranninnenseite nach außen verlagert wird. Die physiologische Barriere der Zellmembran für Propidiumiodid ist bei Nekrose lytischer Zellen aufgehoben.

4.9.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN VON

AKTIVERUNGSMARKERN AN DER OBERFLÄCHE VON T-ZELLEN NACH COKULTUR MIT PDT BEHANDELTEN UND UNBEHANDELTEN U87

Zur Analyse der Aktivierung von T-Zellen wurden die Zellen nach unterschiedlicher Behandlung geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden dann entsprechend auf FACS-Röhrchen verteilt und erneut mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Überstands wurde eine Färbung zur Unterscheidung lebender und toter Zellen durchgeführt, wobei 1 µl blue dye in 50 µl PBS pro 10⁶ Zellen gelöst, die Zellsuspension damit gemischt und für 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Farbstoff-konjugierten Antikörpern gefärbt (Volumen pro 10^6 nach Herstellerangaben) und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurde nochmal gewaschen und die Resuspension am Durchflusszytometer (LSRII) analysiert. Aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren einzelner Fluorochrome muss eine Kompensation durchgeführt werden. Hierfür wurden Kompensationsbeads eingesetzt. Ein Tropfen sowohl positiver als auch negativer Beads wurde mit 50µl PBS vermischt und die mit Farbstoff-konjugierten-Antikörper wurden für 10^6 Zellen hinzugegeben, nach 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands in 350µl PBS resuspendiert. Zur Einstellung der Spannungen für den Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht, abhängig von der Zellgröße), Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht, abhängig von der Granularität der Zellen) oder für die Fluoreszenzsignale wurden zunächst die ungefärbten Kontrollen und dann die Beads und die gefärbten Proben analysiert. Anschließend wurden Beads und gefärbte Proben analysiert. Die Auswertung wurde mit dem Durchflusszytometrie-Analyse-Programm „Flow Jo“ erstellt und Gates nach folgender Strategie gesetzt (Abb. 9): nach Ausschluss von Dubletten wurde die Lymphozyten-Population und daraus die vitale CD3- Population identifiziert. Daraus wurde der CD4 und CD8-Zell-Anteil bestimmt und die Rate CD25, CD69, CD154, CD134, CD137 sowie CTLA4- positiven Zellen analysiert.

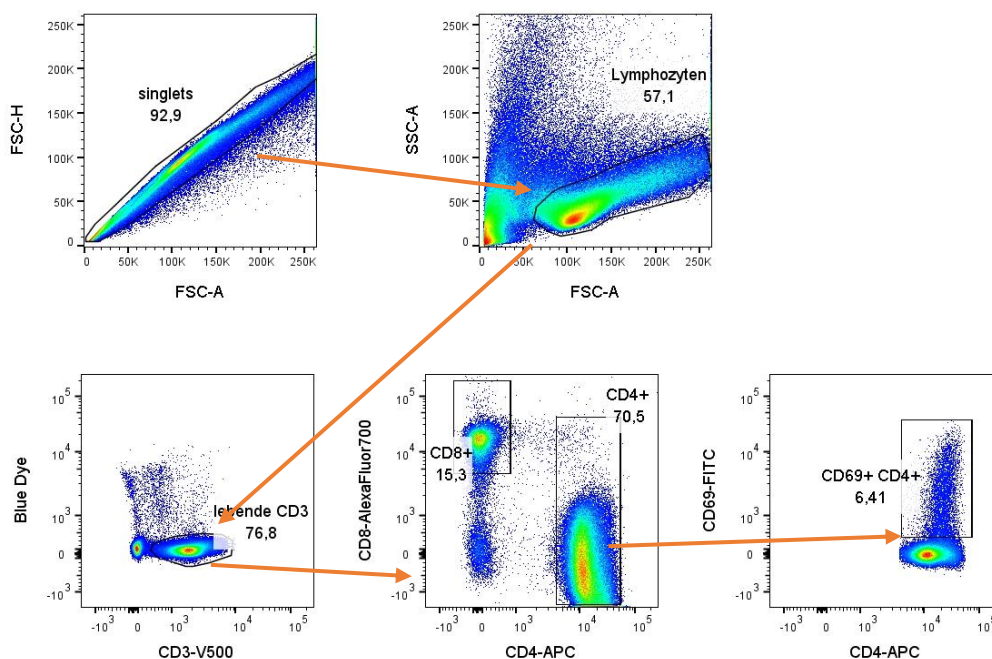


Abb. 9: Übersicht über die Gating-Strategie : Nach Ausschluss von Duplikaten Festlegung der Lymphozytenpopulation, aus dieser wurden tote Zellen ausgenommen und CD4/CD8 –Populationen bestimmt. Dann wurde darunter der Anteil der frühen Aktivierungsmarker der Zellen bestimmt.

4.10 QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION

4.10.1 RNA-ISOLATION

Die RNA-Isolation wurde mittels des Ambion™ RNAqueous total RNA Isolation Kits nach Vorschrift durchgeführt. Dafür wurden die geernteten Zellen in Lysis-Binding-Buffer resuspendiert, die gleiche Menge 64 % Ethanol zugegeben und mittels Vortexer durchmischt. Danach wurden die Zellen auf mit Glasfaser- Filter versehene RNA-Isolation-tubes pipettiert und 20 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, sodass die RNA im Filter erfasst wurde. Danach folgten mehrere Waschschrte um die RNA durch zwei Waschlösungen zu reinigen. Anschließend wurde die in den Glasfasern befindliche RNA mit auf 75°C erhitzter Elutionslösung und 30 Sekunden langer Zentrifugation aus dem Filter gelöst und der DNase-Verdau mit einer Mixtur aus Turbo-DNase und DNase-Puffer eingeleitet. Nach 30 minütigem Verdau bei 37°C wurde die DNase durch DNase Inactivation Reagent für 5 Minuten inaktiviert, das Pellet abzentrifugiert und der RNA-haltige Überstand in ein neues Tube überführt, sodass die RNA-Konzentration mittels Nano-Drop gemessen werden konnte.⁶¹

4.10.2 cDNA-SYNTHESE

Aus isolierter RNA wurde cDNA synthetisiert, indem aus RNA Verdünnungen gleicher RNA-Konzentrationen für alle Proben in einem Volumen von 10 µl erstellt wurden. Zu der 10 µl RNA-Verdünnung wurden 1 µl Random Hexamers, 1 µl Oligo-dT-Primer und 1 µl dNTP gegeben, gemischt und im Thermocycler unter für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Sowohl die Random Hexamers als auch die Oligo-dT-Primer sind Anfangssequenzen, die sich entweder an den Poly-A-Schwanz der RNA oder unspezifisch an verschiedene RNA- Abschnitte anlagern und damit einen Startpunkt für die Synthese der cDNA und die Enzyme darstellen. Direkt nach der Inkubation bei 65 °C zur Denaturierung wurden die Proben für eine Minute auf Eis gestellt, bevor anschließend 4 µl 5x First-Strand-Buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase OUT und 1 µl Super Script Reverse Transcriptase zugegeben wurde und nach Durchmischen für 5 Minuten bei 25 °C, 45 Minuten bei 50 °C und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert wurde.⁶² (s. Abb. 10)



Abb. 10: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese

4.10.3 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Zur quantitativen Bestimmung der RNA wurde die qRT-PCR eingesetzt. Dieses ist ein Verfahren, das unter Zugabe fluoreszierender Sonden zu einer identischen Vervielfältigung umgeschriebener cDNA führt. In eine spezielle 96-Well-Platte wurden 15 µl Mastermix/Well bestehend aus 4,4 µl Wasser, 10 µl FastStart Essential Probes Master und jeweils 0,2 µl forward und reverse Primer für die zu testenden Gene, sowie 0,2 µl fluoreszierende Sonde, eingesetzt. Anschließend wurden 5 µl/Well der Probenverdünnung (enthielt 10 ng cDNA pro Well) dazugegeben. Im Probesmaster sind für die PCR notwendige Reagenzien enthalten, wie Taq-Polymerase und dNTPs. Die Sonden sind 8-9 bp kurze Sequenzen, die an DNA-Sequenzen der zu analysierenden Gene binden. An ihrem 5'-Ende sind sie an einen Reporter-Farbstoff gekoppelt, an ihrem 3'-Ende an einen Quencher-Farbstoff. (siehe Abb. 11) Durch die Nähe heben sich Fluoreszenzsignale auf. Wenn die Sequenzierung durch die Taq-Polymerase bis zur Sonde fortgeschritten ist, kommt es zur Hydrolyse mit Ablösung des Reporter-Farbstoffes und damit zur Fluoreszenz, welche im LightCycler480 detektiert werden kann. Ab einer bestimmten Fluoreszenzstärke wird ein Schwellenwert überstiegen und es kommt zum exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Wird dies bei einem frühen Zyklus erreicht, ist die Menge der detektierten cDNA in der Probe hoch. Bei allen Proben wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. Als Referenzgene („house keeping genes“) wurden ACTB (kodiert für β-Actin) und TBP (kodiert für TATA-Box binding protein) verwendet. Als konstitutiv exprimierte Gene, die möglichst nicht einer Regulation unterliegen, dienen sie der Normalisierung der Genexpressionsdaten. Zielgene waren IL-2, IL-4, IFNG, IL-17A, IL-10, RORc, Foxp3, TNFA, TGFB, IL8 und IL1B aus Pan-T-Zellen bzw. CD8-positiven T-Zellen, zur Analyse der Zytotoxizität bei CD8-positiven Zellen GZMB, PRF1 und IFNG. ⁶³

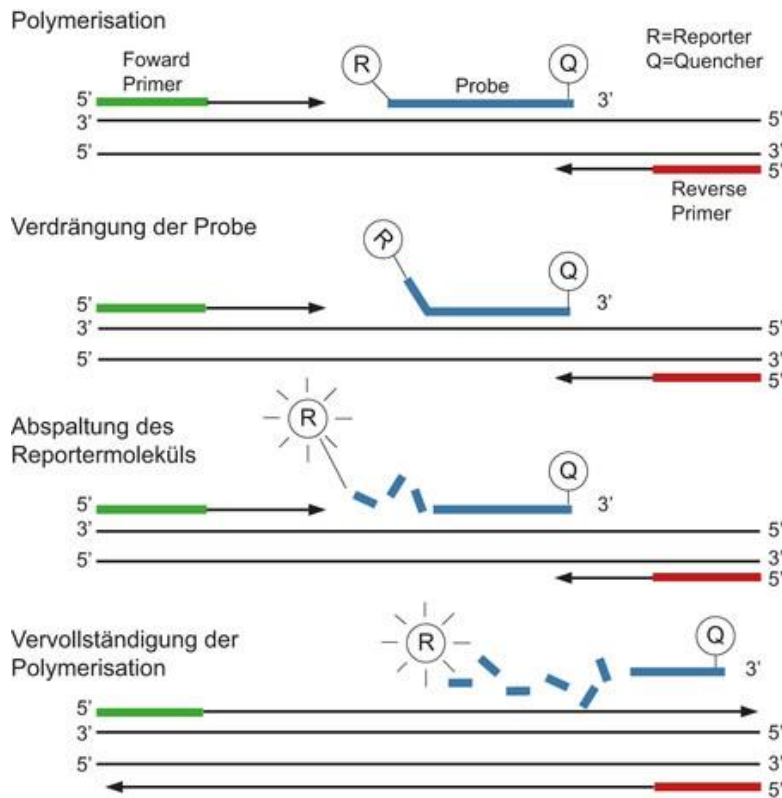


Abb. 11: Schematische Darstellung zum Ablauf der quantitativen real time PCR⁶⁴

4.11 FUNKTIONSASSAYS

4.11.1 ELISPOT (ENZYME LINKED IMMUNO SPOT)-ASSAY ZUR QUANTIFIZIERUNG PERFORIN-SEZERNIERENDER CD8-POSITIVER T-ZELLEN

Um direkt die Funktion der CD8-Zellen zu überprüfen, wurde für diverse Ansätze zusätzlich Perforin-Elispots erstellt. Das Prinzip des Perforin-Elispots ist es, die Perforin-Sekretion der Zellen zu quantifizieren, indem diese Moleküle von der mit Antikörper beschichteten Oberfläche der Wells gebunden werden. Man verwendet Mikrotiterplatten, die mit einer PVDF-Membran beschichtet sind. Auf dieser Membran ist ein Primärantikörper gebunden mit Spezifität für z. B. Perforin. Die Zellen werden hierfür über eine bestimmte Zeit in den Wells kultiviert, dann herausgewaschen. Daraufhin werden mit Farbstoff konjugierte Sekundärantikörper dazugegeben, um die Sekretion quantifizieren zu können. Die sich dadurch ausbildenden Spots können gezählt und damit für eine quantitative Aussage zum Vergleich zwischen den Proben herangezogen werden (Abb. 12). Hierfür wurden kryokonservierte CD8-Zellen, die zuvor aus unterschiedlichen Cokultur-Experimenten isoliert worden waren,

verwendet. Nach dem Auftauen wurden diese gezählt und in Portionen mit jeweils 150 000 Zellen aufgeteilt. Die Vorbereitung erfolgte gemäß dem Protokoll zum Perforin-Elispot durch 30minütige Inkubation mit 50 µl/Well CTL-Medium bei 37°C. Danach wurde dieses abgenommen und die CD8- Zell-Suspension zur Inkubation von je 150 000 Zellen/Well in die Wells verteilt.⁶⁵

Als Medium wurde CTL-Medium verwendet, welches mit IL2 (2 U/ml) und CD28 (1 µg/ml) und L-Glutamin (10 %) angereichert wurde. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 150 µl. Pro Ansatz wurden ein Kontroll-Well und ein Proben-Well pipettiert, wobei die Proben-Wells mit zusätzlich je 5000 U87 als Stimulus versehen wurden.

Diese Ansätze wurden dann für 48h im Brutschrank kultiviert und im Anschluss aus den Wells entfernt. Die Platte wurde fünffach mit PBS (200 µl/Well) gespült und mit 100 µl/ Well Sekundäntikörper (Pf-344-biotin, 1µg/ml verdünnt mit 0,5% FCS-haltigem PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Antikörpers und Waschen (5x 200 µl/Well PBS) wurde 100 µl/Well Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase (ALP) zugegeben (Verdünnung auf 1:1000 mit 0,5% FCS-haltigem PBS, 1 h Inkubation bei Raumtemperatur). Nach einem weiteren Waschschrift wurde das entsprechende Farbstoffbildende Substrat BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) zugegeben und die Platte inkubiert bis sich Spots entwickelten. Um die Farbentwicklung zu stoppen, wurde die Platte intensiv mit destilliertem Wasser gespült und im Dunklen bei Raumtemperatur getrocknet, sodass die Spots bei vollständiger Trockenheit der Platte im Elispot-Reader ausgezählt werden konnten⁶⁵

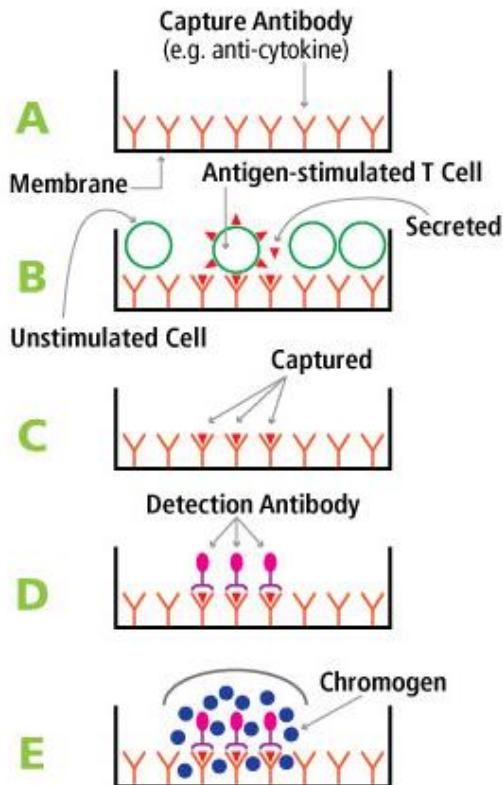


Abb. 12: Schematische Darstellung zum Elispot.¹

Auf eine mit spezifischen Antikörpern beschichtete Platte werden die zu untersuchenden Zellen (CD8) gegeben und stimuliert (mit U87 und IL2). Nach einer 48 stündigen Inkubation, in der sezerniertes Perforin von den Antikörpern gebunden wird, werden die Zellen entfernt und ein biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben. Anschließend werden mit Hilfe eines Streptavidin-gekoppelten Enzyms und einem Substrat farbige Spots erzeugt, die anschließend quantifiziert werden.

4.11.2 CALCEIN- ACETOXYMETHYL(AM)-ASSAY

Hierbei handelt es sich um ein Assay zur Bestimmung der Zelllyse. Die Tumorzellen werden mit Calcein-AM inkubiert, sodass dieses durch Diffusion die Zellmembran passieren kann. In die Zellen aufgenommen, wird die Esterverbindung zwischen Calcein und dem Acetoxymethylrest enzymatisch gespalten. Calcein selbst kann nicht mehr durch die Membran diffundieren und bleibt somit in der intakten Zelle. Bei Zugabe von PBMC kommt es zur Lyse der Tumorzellen und damit zum Austritt von Calcein ins Medium. Aus dem Überstand kann die Calcein-Fluoreszenz gemessen werden und die Lyserate verschiedener Proben verglichen werden. (s. Abb.13)

Vorbereitet wurde ein 96-Well-Platte, auf welcher U87-Zellen (10 000/Well) ausgesät und für 20 h kultiviert wurden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die U87-Zellen wurden mit in DMSO gelöstem und mit PBS auf 8 µM verdünntem Calcein-Acetoxymethyl für 45 Minuten inkubiert. Der Calcein-Überstand wurde dann wieder mit PBS ausgewaschen.

PBMC wurden frisch aus der 48 h-Cokultur mit PDT-behandelten und nicht behandelten U87-Zellen abgenommen und gewaschen. Anschließend wurden je 100 000 PBMC zu den Calcein-gelabelten U87-Zellen gegeben und diese in Normalmedium für 8 h inkubiert. Im Anschluss wurde aus jedem Well die Hälfte des Überstandes abgenommen und die Fluoreszenz des darin

Methoden

enthaltenden Calcein mittels eines Fluoreszenz-Readers gemessen (Anregungsspektrum von 485-12 nm, Emissionsspektrum von 520 nm).^{66 67}

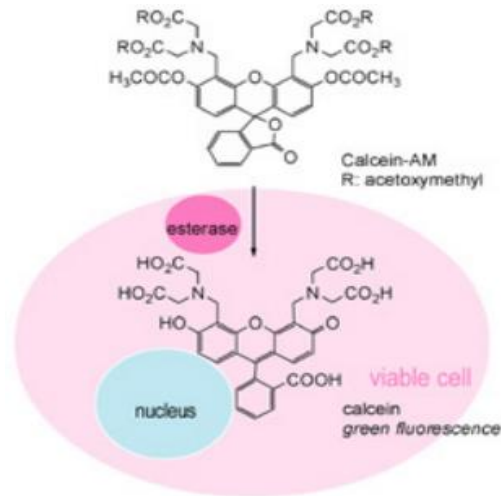


Abb. 13: Schematische Darstellung des Calcein AM Assays.⁶⁸ Calcein-AM wird in die Zelle aufgenommen, dort spaltet eine intracelluläre Esterase Actoxymethyl von Calcein ab. Hydrophiles Calcein kann die Membran nicht mehr passieren und fluoresziert. Für das Assay wird das von lysierten Zellen freigesetzte Calcein im Überstand quantifiziert.

5 ERGEBNISSE

5.1 ETABLIERUNG EINES MIT DER IN-VIVO-SITUATION VERGLEICHBAREN IN-VITRO-MODELLS FÜR PDT AN GLIOBLASTOMZELLEN

Um die Komponenten der photodynamischen Therapie in-vitro angemessen der in-vivo-Situation anzupassen, war es nötig, im Vorfeld geeignete Bedingungen hierfür zu entwickeln. Dazu zählen Dauer und Konzentration der 5-ALA-Inkubation, Bestrahlungsdosis, das Zellverhältnis und genaue Umsetzung der Cokultur.

5.1.1 BESTIMMUNG DER OPTIMALEN 5-ALA-KONZENTRATION

Zunächst wurde somit das Protoporphyrin- Fluoreszenzverhalten von in 5-Aminolävulinsäure inkubierten U87-Zellen untersucht. Es kam zu einem linearen Anstieg bis zu einer 5-ALA-Konzentration von 50 µg/ml, wo die Fluoreszenz bei ca. 10 000 RFU (Relative Fluorescence Units) ein Plateau erreichte. Auch bei weiter steigenden Konzentrationen von 5-ALA war kein weiterer Anstieg der Fluoreszenz mehr detektierbar (s. Abb. 14). Um der in-vivo-Situation nahe zu kommen, in der nicht alle Zellen eine maximale Protoporphyrin-IX-Konzentration erreichen, wurde für alle weiteren Experimente die Konzentration der 5-Aminolävulinsäure auf 25 µg/ml mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden festgesetzt. Außerdem wurde Toxizität von 5-ALA allein mittels CellTiter®-Blue-Assay (CTB) bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Vitalität auch bei hohen 5-ALA- Konzentrationen nicht vermindert ist, d.h., dass 5-ALA auch in hoher Konzentration keine Zellschädigung auslöst (s. Abb. 14, rote Kurve).

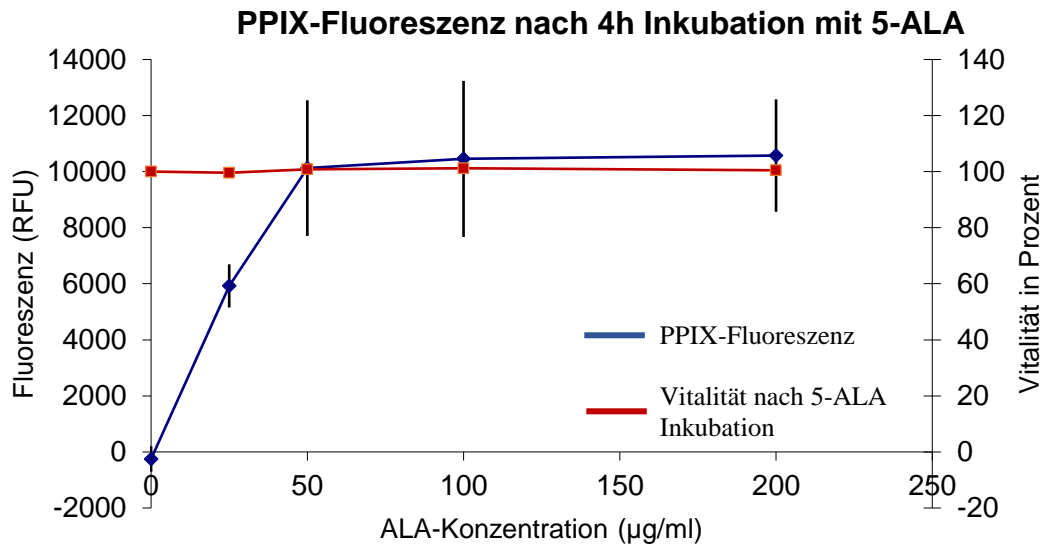


Abb. 14: PPIX-Fluoreszenz: Fluoreszenzmessung nach 4 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-ALA. Nach Abwaschen und Abspülen der Lösung gemessen im Fluoreszenzreader. Blaue Kurve: PPIX Fluoreszenz mit Angabe des Standardfehlers (SEM). Zusätzlich Bestimmung der Vitalität in % der Zellen mit CellTiter®-blue-Assay zum Ausschluss der Toxizität von 5-ALA. Rote Kurve: Vitalität der U87-Zellen (in %) nach 5-ALA Inkubation. (jeweils n=3)

5.1.2 BESTIMMUNG EINER LICHTDOSIS

Nach Festlegung der 5-ALA-Konzentration mussten auch die Bedingungen für die Bestrahlung mit Laserlicht bestimmt werden. Hierfür wurde die Zellvitalität mittels CellTiter®-Blue-Assay 4 und 24 Stunden nach Behandlung mit Lichtdosen zwischen 0 und 20 J/cm² gemessen. Zu beiden Zeitpunkten sank die Vitalität der Zellen mit steigender Lichtdosis (s. Abb. 15 und 16). Bei der höchsten gewählten Lichtdosis waren jeweils noch wenige vitale Zellen detektierbar. Zu beiden Zeitpunkten wurde die Vitalität von U87 ohne vorangegangene 5-ALA-Inkubation nach höchster Bestrahlungsdosis (20 J/cm²) gemessen. Es kam jeweils nur zu einer geringen Minderung der Vitalität (Mittelwert 4h nach PDT = 97 %, 24h nach PDT= 90 %) (s. Abb. 15 und 16).

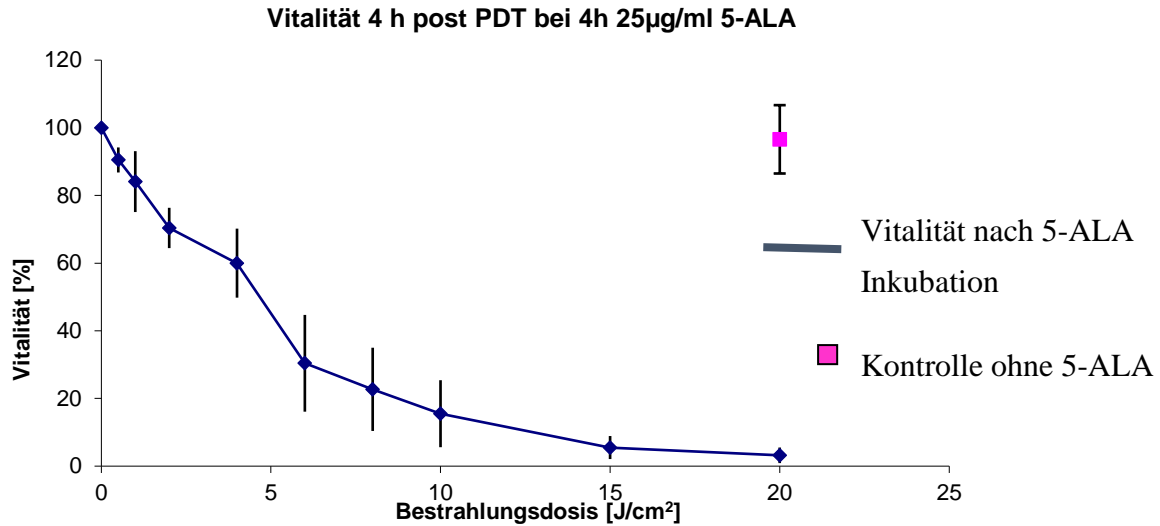


Abb. 15: Vitalität 4 h nach PDT mit unterschiedlichen Lichtdosen: Die U87-Zellen wurden für 4 Stunden bei einer Konzentration von 25µ g/ml 5-ALA inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Lichtdosen bestrahlt. Nach 4 h wurde die Vitalität der Zellen mittels eines Celltiter®-blue-Assays bestimmt. (n=3)

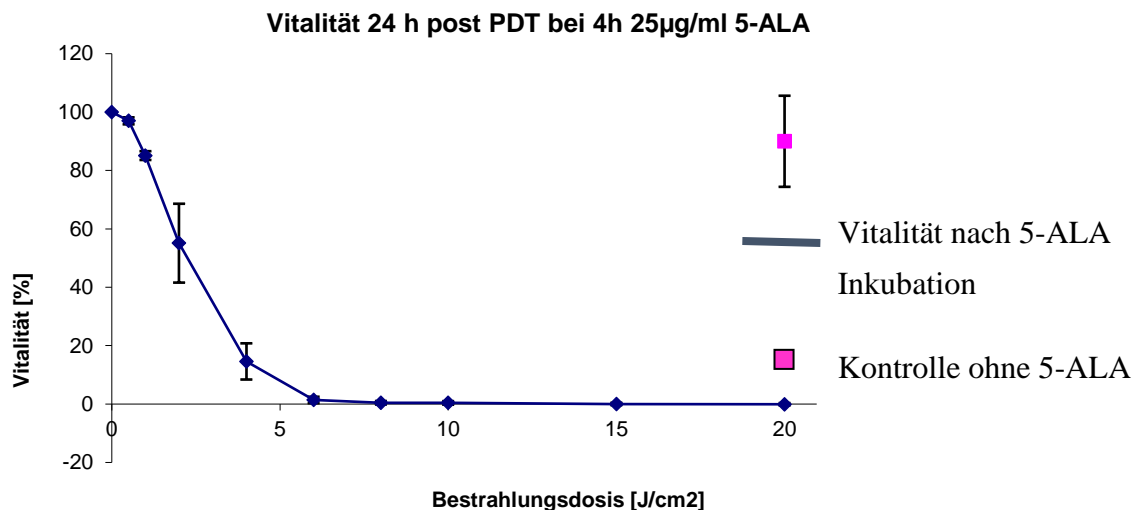


Abb. 16: Vitalität 24 h nach PDT mit unterschiedlichen Lichtdosen: Die Zellen wurden für 4 Stunden bei einer Konzentration von 25 µg/ml 5-ALA inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Lichtdosen bestrahlt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen mittels eines Celltiter®-blue-Assays bestimmt. (n=3)

5.1.3 ZEITKINETIK ZUR U87-VITALITÄT NACH PDT

Um zu untersuchen, wie sich die Vitalität der Zellen im längeren Verlauf nach PDT verhält, wurde eine Zeitkinetik für die Lichtdosen 3, 4, 5 J/cm² erstellt. Diese Lichtdosen wurden gewählt, da bei mehr als 6 J/cm² schon nach 24 h keine vitalen Zellen mehr gemessen werden konnten (s. Abb. 17). Die Messungen erfolgten zwischen 4 und 48 h nach PDT. Es zeigte sich über die ersten 24 h ein kontinuierlicher Abfall der Zellvitalität auf unterschiedlichem

Ergebnisse

Vitalitätsniveau. Bei 3 J/cm^2 verringerte sich die Vitalität von durchschnittlich $64 \% \pm 7 \%$ nach 4 h auf $31 \% \pm 10 \%$ nach 24 h. Nach 48 h kam es zur Regeneration und zum erneuten Anstieg auf $42 \% \pm 17 \%$. Dagegen wurde bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 4 h nach PDT eine Viabilität von $37 \% \pm 13 \%$ gemessen, nach 12 h wurde ein niedriges Vitalitätsniveau von unter 10 % ohne erneuten Anstieg im Beobachtungszeitraum beobachtet (s. Abb.17).

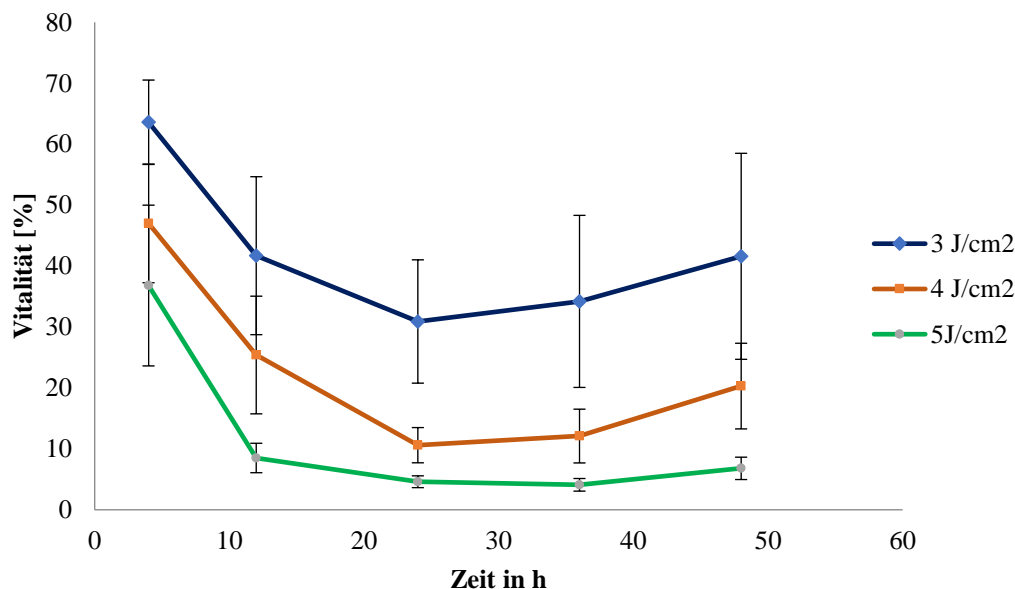


Abb. 17: Zeitkinetik über die Vitalität der U87 nach PDT: Die Zellen wurden für 4 Stunden bei einer Konzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ 5-ALA inkubiert und anschließend mit 3 verschiedenen Lichtdosen bestrahlt. Die Vitalität der Zellen mittels eines Celltiter®-blue-Assays wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 4 und 48 Stunden bestimmt. (n=3)

Zudem wurden für die verwendeten drei verschiedenen Lichtdosen ($1, 3, 5 \text{ J/cm}^2$) Apoptose und Nekrose nach Färbung im Durchflusszytometer gemessen. Hierzu wurden FITC-Annexin und Propidiumiodid (PI) verwendet. Apoptotische Zellen sind dann FITC-Annexin positiv, nekrotische Zellen positiv für PI. FITC-Annexin und PI positive Zellen werden zu den nekrotischen Zellen gezählt. Es zeigte sich schon bei unbehandelten Zellen ein geringer Anteil toter Zellen ($4,68 \% \text{ FITC-Annexin+}$, $6,2 \% \text{ PI+}$) was auf Manipulation im Rahmen der Zellkultur sowie auf physiologischen Zelluntergang zurückzuführen ist. Bei geringer Bestrahlungsdosis von 1 J/cm^2 zeigte sich nach 24 h nur ein geringer Anstieg toter Zellen ($6,6 \% \text{ FITC-Annexin+}$, $7,5 \% \text{ PI+}$). Bei einer Dosis von 3 J/cm^2 waren $8,85 \%$ der Zellen FITC-Annexin+ und $17 \% \text{ PI+}$. Dagegen war der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bei 5 J/cm^2 deutlich höher ($9,76 \% \text{ FITC-Annexin+}$, $65,2 \% \text{ PI+}$) (s. Abb.18)

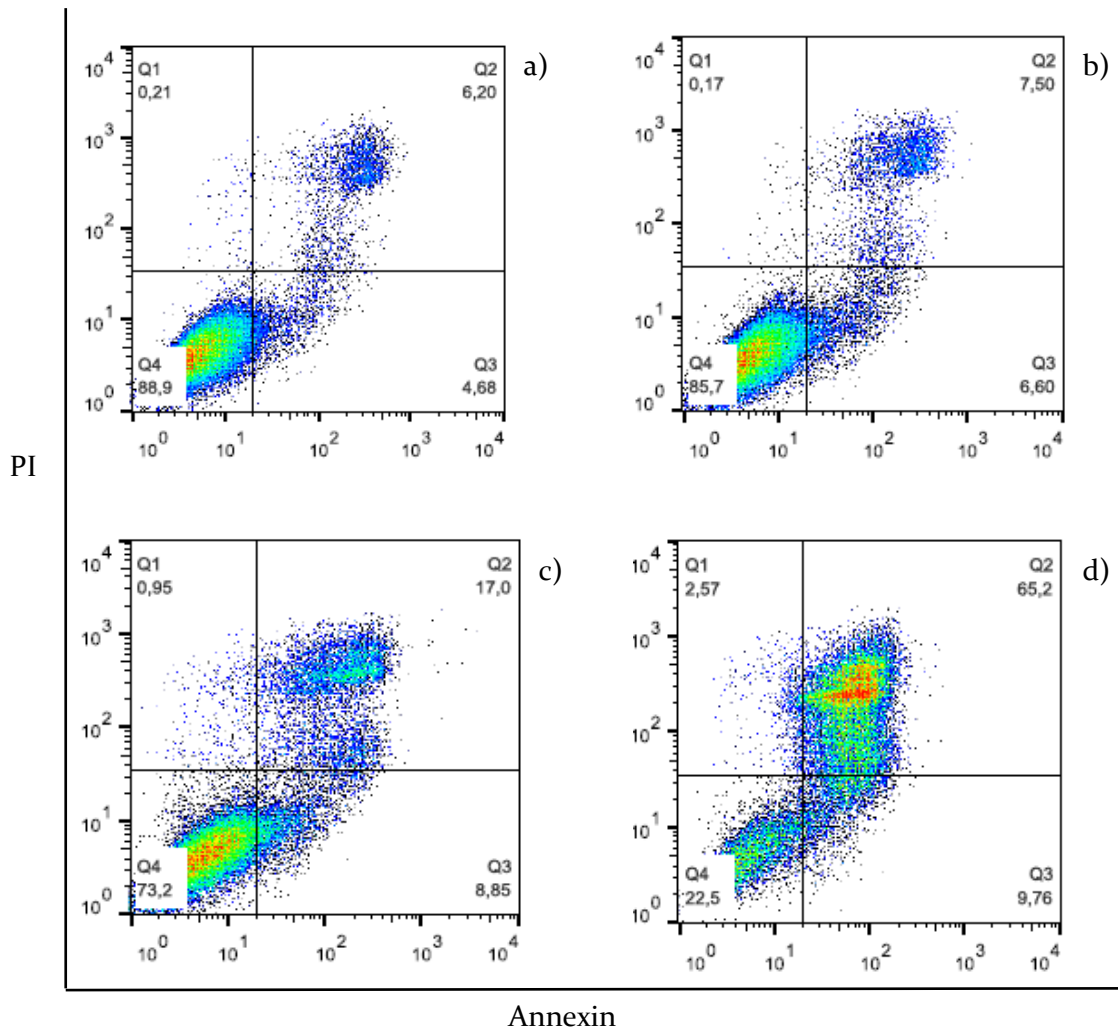


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse der Zelltod-Mechanismen. 24h nach PDT bei unterschiedlichen Lichtdosen (1, 3, 5 J/cm²). Apoptoserate nach PDT gemessen anhand des FITC-Annexin positiven Zellaseanteils; Nekroserate anhand des PI positiven Zellanteils. a) U87 ohne Behandlung, b) U87 nach PDT mit 1 J/cm², c) U87 nach PDT mit 3 J/cm², d) U87 nach PDT mit 5 J/cm²

5.1.4 ZUSAMMENFASSUNG DER FESTGELEGTE BEDINGUNGEN FÜR DIE IN-VITRO-PDT

Aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit und Aufnahme von 5-Aminolävulinsäure in die Tumorzellen in-vivo wurde für die Inkubation mit 5-ALA eine Konzentration von 25 µg/ml gewählt. Da hier die PPIX-Fluoreszenz der U87-Zellen noch im linear ansteigenden Teil des Graphen liegt, kann davon ausgegangen werden, dass auch in-vitro noch nicht alle U87-Zellen vollständig mit 5-ALA gesättigt sind.

Um der in-vivo-Situation nahe zu kommen, bei der Tumorzellen in den Randbereichen der Laserlicht-Streuung mit anderen Lichtdosen als zentral gelegene Zellen konfrontiert sind, wurde für nachfolgende Versuche ein Bestrahlungsprotokoll festgelegt, das die unterschiedlich

starke Schädigung der Zellen berücksichtigt. Hierbei wurden nach Inkubation mit der gleichen 5-ALA-Konzentration drei unterschiedliche Bestrahlungsdosen (1, 3, 5 J/cm²) angewendet und die Zellen nach PDT in gleichem Verhältnis gemischt.

5.2 ETABLIERUNG EINES MODELLS ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT

Neben der Festlegung der PDT-spezifischen Komponenten war es ebenso wichtig, ein Modell für den Kontakt von U87 mit T-Zellen zu entwickeln. Die Schwierigkeit hierbei war es, sich möglichst auf die relevanten Komponenten zu reduzieren, um potentielle Verzerrungen zu verhindern; gleichzeitig mussten jedoch alle für eine adaptive Immunantwort nötigen Faktoren vorhanden sein.

Folgende experimentelle Ansätze wurden evaluiert:

PanT-Zell-Kultur im Überstand PDT-behandelter und unbehandelter U87

→ Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinexpression

PanT-Zellen in direkter Cokultur mit PDT-behandelten und unbehandelten U87

→ Expression von Aktivierungsmarkern

PBMC in direkter Cokultur mit PDT-behandelten und unbehandelten U87, nachfolgend Isolierung von PanT-Zellen und CD8-positiven T-Zellen

→ Analyse der Zytokinexpression und der Funktionalität der Immunzellen

5.2.1 ANALYSE VON T-ZELLEN NACH KULTIVIERUNG IM 48H-ÜBERSTAND VON BEHANDELTEN U87

Im 48h- Überstandsmedium behandelter und nicht behandelter U87-Zellen wurden zuvor isolierte PanT-Zellen über verschiedene Zeiträume kultiviert, und die RNA-Expression verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren wurde nach 24 und 48 Stunden bestimmt. Für die Auswertung wurde je Versuch eine Normalisierung durch Quotientenbildung aus PanT mit PDT-U87-Kontakt/ Pan-T ohne PDT-U87-Kontakt gebildet, sodass der Wert für die Proben PanT ohne PDT-U87-Kontakt immer gleich 1 beträgt.

Untersucht wurden IL2, IFNG, IL4, TNFA, IL17A, RORc, Foxp3, IL10 und TGFB. Bei diesen Ansätzen war kein signifikanter Unterschied in der RNA-Expression festzustellen.

5.2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON OBERFLÄCHENAKTIVIERUNGSMARKER NACH KULTUR VON T-ZELLEN IM ÜBERSTAND VON BEHANDELTEN U87 BZW. NACH DIREKTEM KONTAKT MIT U87-ZELLEN

Um zu erkennen, ob ein direkter Kontakt mit GBM-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Reaktion von T-Zellen auf die PDT spielt, wurden die Aktivitätsmarker an der T-Zellen-Oberfläche durch Durchflusszytometrie nach Cokultur bzw. Kultur im Überstand analysiert. Hierfür waren PanT-Zellen vor Kontakt mit U87 bzw. U87-Überstand isoliert worden; die Inkubation wurde jeweils für eine Dauer von 24 und 48 (Überstand) bzw. von 24 und 96 Stunden (Zell-Zell-Interaktion) unter CD3/CD28-Stimulation im Verhältnis U87:PanT von 1:10 durchgeführt. Zur Untersuchung der T-Zell-Aktivität wurden CD25, CD69, CD154 und CD134 analysiert. Es kam in beiden Ansätzen zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivitätsmarker und damit konnte weder durch Kontakt der T-Zellen mit Überstand von behandelten U87 noch durch direkten Kontakt der T-Zellen mit behandelten U87 ein Effekt auf T-Zellen gezeigt werden (s. Abb 19). CD8 positive Zellen zeigten, wie in Abb.19 dargestellt eine geringgradige Tendenz in Richtung einer höheren Expression von Aktivierungsmarkern an der Zelloberfläche.

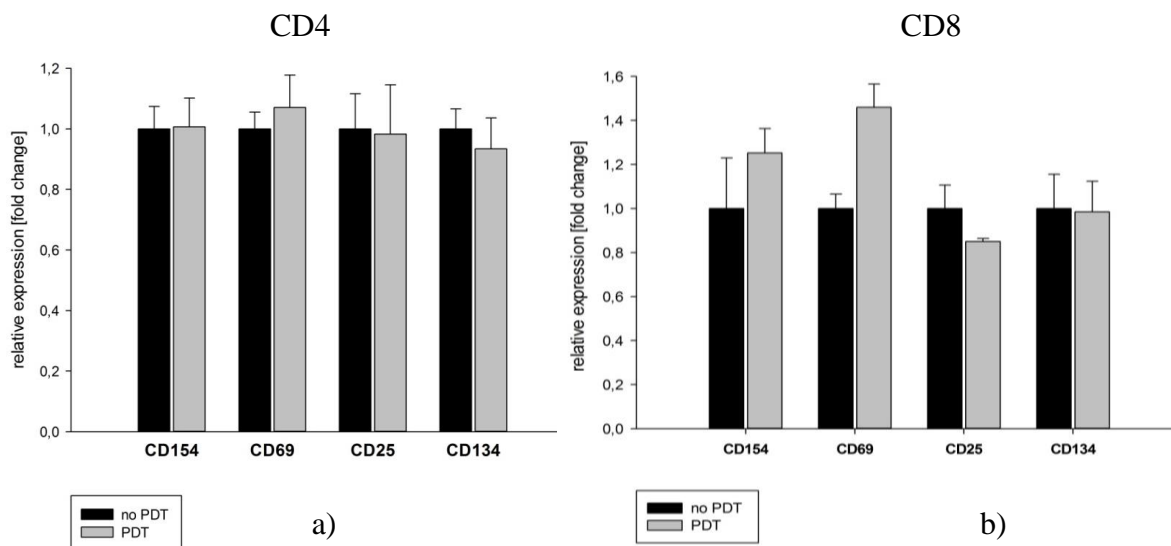


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsmarker von T-Zellen. Tendenzielle Mehraktivierung der CD8-T-Zellen (b) nach Kontakt mit PDT-behandelten U87. (n=2)

5.2.3 ANALYSE DER GENEXPRESSION IN PBMC NACH COKULTUR MIT PDT-BEHANDELTEN U87

Da bei der Cokultur von T-Zellen und U87 antigenpräsentierende Zellen fehlen, wurden diese in den folgenden Versuchen mitberücksichtigt. Hierfür wurde ein direkter Kontakt von PBMC zu U87-Zellen hergestellt. Bei PBMC handelt es sich nicht um eine einheitliche Zellpopulation; PBMC setzen sich aus verschiedenen Immunzellen zusammen: Lymphozyten (70-90 %), Monozyten (5 %), and und zu einem geringen Anteil dendritische Zellen (1-2 %). Bei der Lymphozyten-Population handelt es sich um NK-Zellen, B-Zellen (ca. 15 %) und überwiegend um CD3+ T-Zellen (ca. 70 % der PBMC), welche sich wiederum aus CD4 (25-60 %) und CD8 (5-30 %) positiven T-Zellen zusammensetzen^{54,69,70}. Funktionell liefert die Komposition der PBMC eine Interaktion aus unterschiedlichen Zelltypen mit konsekutiver Generierung einer Immunantwort. Durch die dendritischen Zellen werden Antigene erkannt, prozessiert und den T-Zellen präsentiert, sodass eine zelluläre oder humorale Immunantwort induziert werden kann.

Für dieses Experiment wurden PDT-behandelte und unbehandelte U87-Zellen und PBMC in einem Verhältnis von $0,4 \cdot 10^6$ U87: $4 \cdot 10^6$ PBMC für 48 Stunden kokultiviert. Zusätzlich wurden reine PBMC ohne U87-Kontakt als Kontrolle kultiviert. Danach wurden aus allen Ansätzen die PanT-Zellen isoliert und die Genexpression verschiedener Zytokine und zytolytischer Proteine analysiert.

Nach Kontakt der PBMC mit unbehandelten U87-Zellen konnte in den PanT-Zellen eine Suppression der Genexpression von IL2, IFN γ , GranzymB und Perforin beobachtet werden. Durch Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen fiel die Suppression deutlich geringer aus (s. Abb. 20).

Ergebnisse

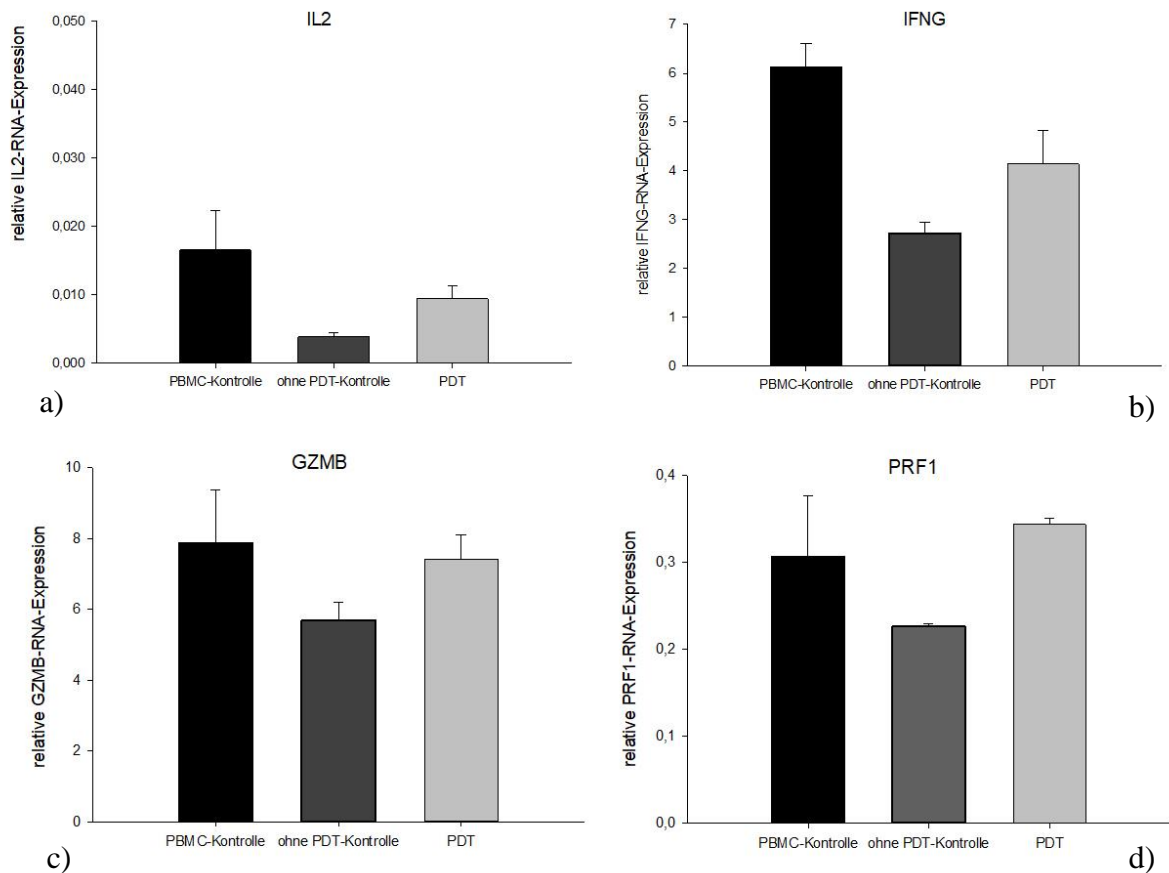


Abb. 20: Genexpression von IL2, IFNG, GZMB und PRF in PanT-Zellen nach Cokultur von U87 und PBMC (Ausführung in Duplikaten). Die Messung erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Es zeigt sich eine abnehmende Expression nach Kontakt mit U87-Zellen. bei mit PDT-behandelten U87 kommt es zu einem Anstieg von IL2 (a) und insbesondere der Zytotoxizitätsmarker IFNg (b), GZMB (c) und PRF (d). Gezeigt ist die relative Expression der RNA, normalisiert auf die Referenzgene.

5.2.4 ZUSAMMENFASSUNG DES ETABLIERTEN MODELLS FÜR WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN

Zusammengefasst konnte ein Gesamtmodell für die in-vitro-Untersuchung der PDT etabliert werden. Die in-vitro-PDT wurde nach vierstündiger Inkubation der U87-Zellen in ALA-Mediums einer Konzentration von 25 µg/ml durchgeführt. Aus frischem Vollblut eines gesunden Spenders isolierte PBMC wurden mit den PDT-behandelten oder unbehandelten U87-Zellen als Kontroll-Gruppe (Verhältnis U87:PBMC 1:10) direkt für 48h kokultiviert. Nach 48h konnten die Zellen geerntet und daraus T-Zellen bzw. T-Zell-Subpopulationen gewonnen werden. Die Analyse erfolgte mittels unterschiedlicher Methoden. Abbildung 21 zeigt die Zusammenfassung des etablierten Modells.

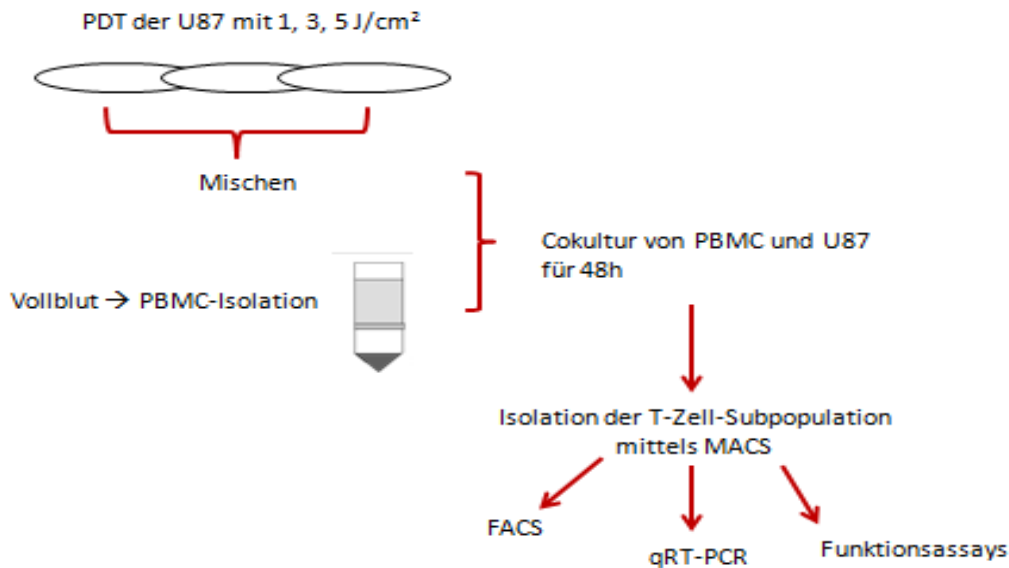


Abb. 21: Schematische Darstellung des In-vitro-Modells zur Analyse der T-Zellantwort nach Kontakt mit PDT-behandelten Glioblastomzellen

5.2.5 CHARAKTERISIERUNG DER ZYTOLYSE DURCH CD8-POSITIVE ZELLEN NACH DIREKTEM KONTAKT MIT BEHANDELTEN TUMORZELLEN

5.2.5.1 ANALYSE DER EXPRESSION ZYTOLYTISCHER PROTEASEN UND PROTEINE NACH KONTAKT MIT PDT-BEHANDELTEN U87-ZELLEN

Aufgrund des gezeigten Anstiegs der Expression zytolytischer Zytokine in PanT-Zellen nach Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen wurden nachfolgend reine CD8-positive T-Zellen untersucht. Hierfür wurden erneut Cokulturen PDT-behandelter und unbehandelter U87-Zellen und PBMC ($0,8 \times 10^6$ U87: 8×10^6 PBMC) angesetzt, 48 h inkubiert und anschließend reine CD8-Zellen separiert. Um eine differenzierte Aussage über die zytotoxische Antwort gewährleisten zu können, wurde zuvor die Reinheit der CD8-positiven T-Zellen nach Isolierung durch FACS-Analysen überprüft. Der Anteil der CD8-positiven T-Zellen nach Isolation aus PBMC mittels autoMACS betrug 97,3 %.

Nach 48 h andauernder Cokultur von PBMC mit PDT-behandelten U87-Zellen zeigte sich bei der Analyse klassischer zytotoxischer Proteine eine Zunahme der RNA-Expression von PRF1 in CD8-positiven T-Zellen (Mittelwert \pm SD: $1,60 \pm 0,29$; $p = 0,0095$) (s. Abb. 22). GranzymB hingegen zeigte bei der Analyse probandenabhängige Schwankungen um den Ausgangswert (Mittelwert \pm SD: $1,28 \pm 0,39$; $p = 0,33$) (s. Abb. 24). Interferon γ hingegen zeigte ebenso einen deutlichen Anstieg (Mittelwert \pm SD: $1,78 \pm 0,44$; $p = 0,03$) (s. Abb. 23).⁷¹ Hiermit konnte gezeigt werden, dass durch PDT behandelte U87 einen stimulierend wirkenden Effekt auf CD8-positive T-Zellen haben und vermehrte Lyseaktivität induziert wird.

Ergebnisse

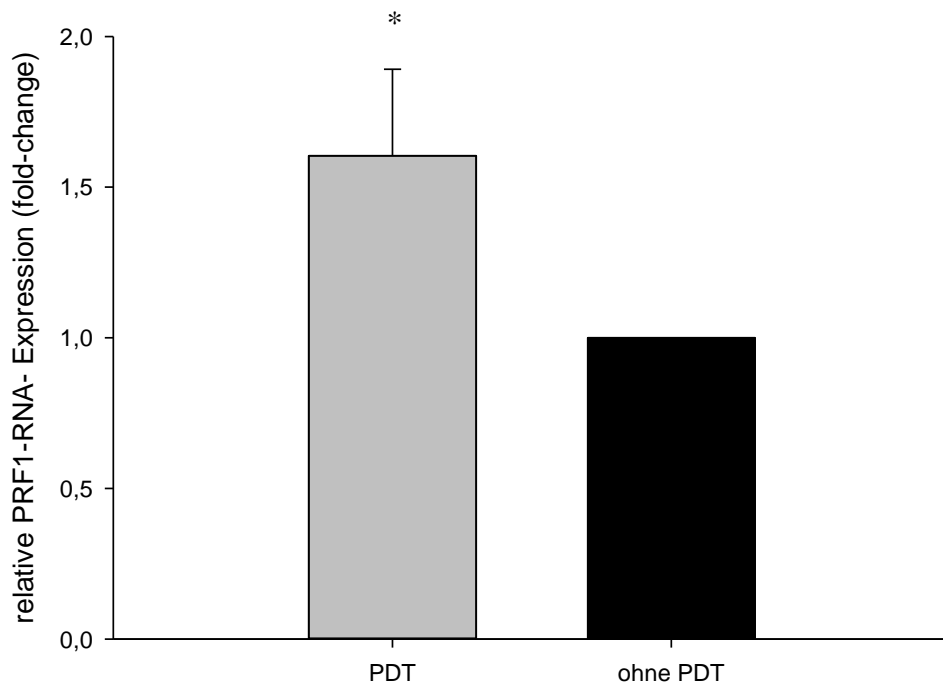


Abb. 22: PFR-Expression CD8-positiver T-Zellen. Nach 48 h-Cokultur von PBMC mit behandelten (mit PDT) und unbehandelten (ohne PDT) U87 wurden CD8-positiven T-Zellen isoliert und daraus die Expression von PRF mittels qRT-PCR gemessen. Zur Vergleichbarkeit wurde auf die „ohne PDT U87 – Cokultur“ normalisiert (ohne PDT=1). (n=16, p=0,0095)

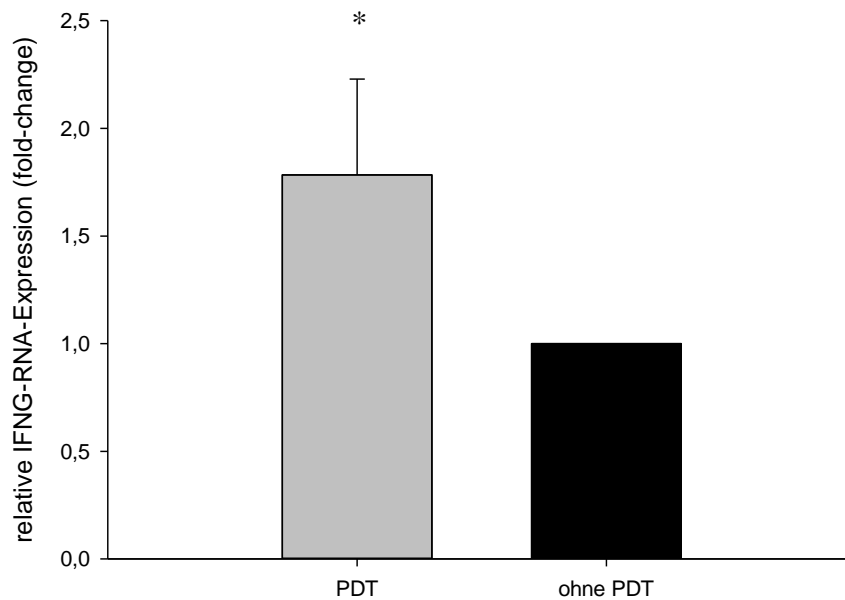


Abb. 23: IFNg-Expression aus CD8 positiven T-Zellen. Nach 48 h-Cokultur von PBMC mit behandelten (mit PDT) und unbehandelten (ohne PDT) U87 wurden CD8 isoliert und daraus die Expression von IFNg mittels qRT-PCR gemessen. Zur Vergleichbarkeit wurde auf die „ohne PDT U87 – Cokultur“ normalisiert (ohne PDT=1). (n=16, p=0,03)

Ergebnisse

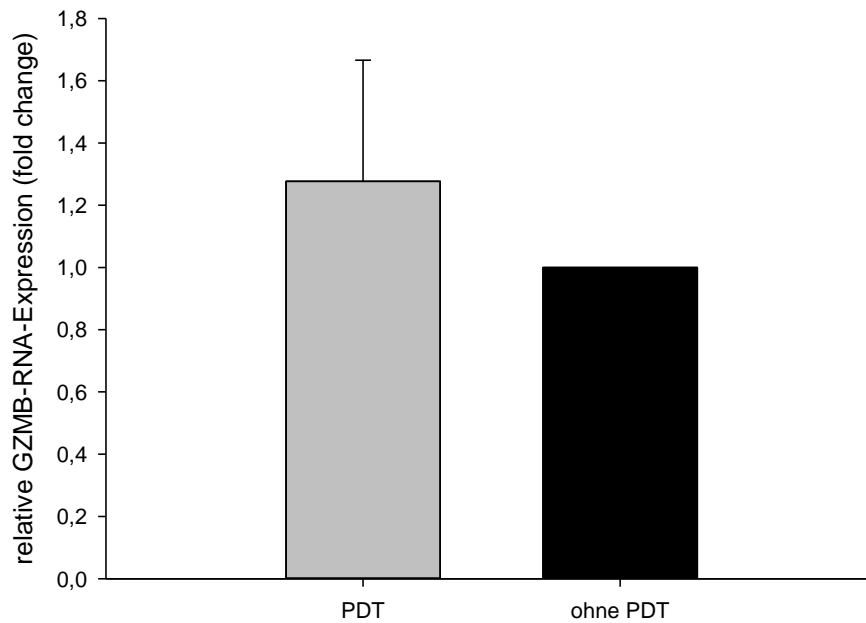


Abb. 24: GZMB-Expression aus CD8 positiven T-Zellen. Nach 48h-Cokultur von PBMC mit behandelten (mit PDT) und unbehandelten (ohne PDT) U87 wurden CD8 isoliert und daraus die Expression von GZMB mittels qRT-PCR gemessen. Zur Vergleichbarkeit wurde auf die „ohne PDT U87 –Cokultur“ normalisiert (ohne PDT=1). (n=16, p=0,33)

5.2.5.2 ANALYSE DER PERFORIN-PRODUKTION VON CD8-POSITIVEN ZELLEN NACH REKONTAKT MIT UNBEHANDELTEN U87-ZELLEN

Um neben der Genexpression auch die Proteinsekretion und somit die Funktionalität der CD8-positiven T-Zellen zu bestimmen, wurde ein Perforin-Elispot-Assay durchgeführt und die Perforin-Produktion nach Stimulation mit U87 gemessen. Die CD8⁺ T-Zellen waren hierfür im Vorfeld schon für 48 h mit PDT-behandelten bzw. unbehandelten U87-Zellen kokultiviert worden (=Priming-Ansatz).

Zur Überprüfung der Auswirkung dieser unterschiedlichen Prägung auf die zytotoxischen T-Zellen wurde eine Restimulation mit unbehandelten U87-Zellen angesetzt und die Perforin-Sekretion mittels ELISPOT bestimmt. Zur Darstellung der Basisrate der Sekretion der CD8 wurden Kontroll-Wells mit CD8-Proben ohne U87-Kontakt angesetzt. Aus der Anzahl der mittels Elispot-Reader gemessenen Spots in den Proben mit und ohne U87-Stimulation wurde für jede Probe ein Quotient (mit U87/ ohne U87) gebildet. So konnten die Quotienten für die Proben mit PDT-U87-geprimten CD8-positiven Zellen und ohne PDT-U87-geprimten CD8-positiven Zellen miteinander verglichen werden. Um den individuellen Einfluss zu eliminieren, wurde für alle Spender auf die ohne PDT-U87-geprimten CD8-positiven T-Zellen normalisiert (Bildung des Quotienten aus Ratio mit PDT-U87/Ratio ohne PDT-U87). Wie in Abb. 25

Ergebnisse

dargestellt, kam es zu einer signifikant verstärkten relativen Perforin-Spot-Bildung (Mittelwert \pm SD = $1,32 \pm 0,1$; n=8; p=0,03) bei den CD8-Ansätzen, welche zuvor mit PDT-behandelten U87 kokultiviert worden waren.

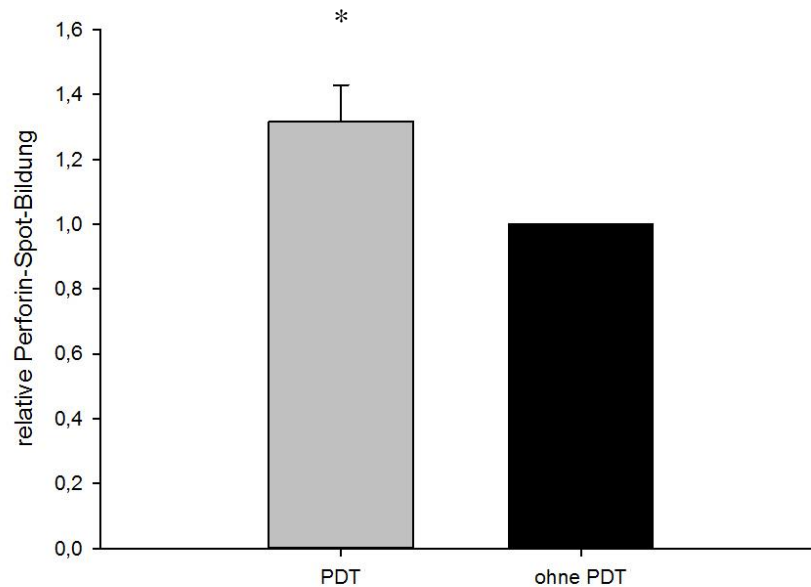


Abb. 25: Perforin-Elispot mit U87 als Restimulus . Bei Restimulus von CD8-Zellen, welche durch PDT-behandelte U87 geprimt wurden, kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Perforin im Vergleich zu CD8+-Zellen, die mit unbehandelten U87 -Zellen werden. Normalisierung auf CD8 T-Zellen mit unbehandelten U87. (n=8, p= 0,03)

5.2.5.3 IM CALCEIN-AM-ASSAY WERDEN U87 VON PDT-U87- SENSIBILISIERTEN PBMC STÄRKER LYSIERT

Ein weiterer Funktionsassay zur Bestimmung der lytischen Aktivität stellte der Calcein-Assay dar, bei dem die Reaktion der PBMC nach Priming mit behandelten und unbehandelten U87 auf erneuten Kontakt mit U87 getestet wurde. Hierbei zeigte sich, dass diejenigen PBMC, die im Vorfeld mit PDT-behandelten U87 in Kontakt waren, eine höhere Lyserate vorweisen konnten, als diejenigen, die mit unbehandelten U87 kokultiviert worden waren. Durch Normalisierung anhand der U87 Kontrolle konnten die beiden Gruppen verglichen werden (PBMC nach Kokultur mit behandelten bzw. unbehandelten U87/ reine U87-Kontrolle) und zeigen so über die Calcein-Fluoreszenz eine ca. 11 % höhere Zytotoxizitätsrate in der PDT-Gruppe (Mittelwert \pm SD = $1,11 \pm 0,025$ gegenüber $1,0 \pm 0,039$ in der Kontrollgruppe) (n=6; p=0,02). Die PBMC-Kontrolle ohne U87-Kontakt weist eine höhere Lyserate auf, als PBMC nach vorherigem Kontakt mit unbehandelten U87-Zellen (Quotient (Mittelwert \pm SD) = $1,07 \pm 0,02$).

Ergebnisse

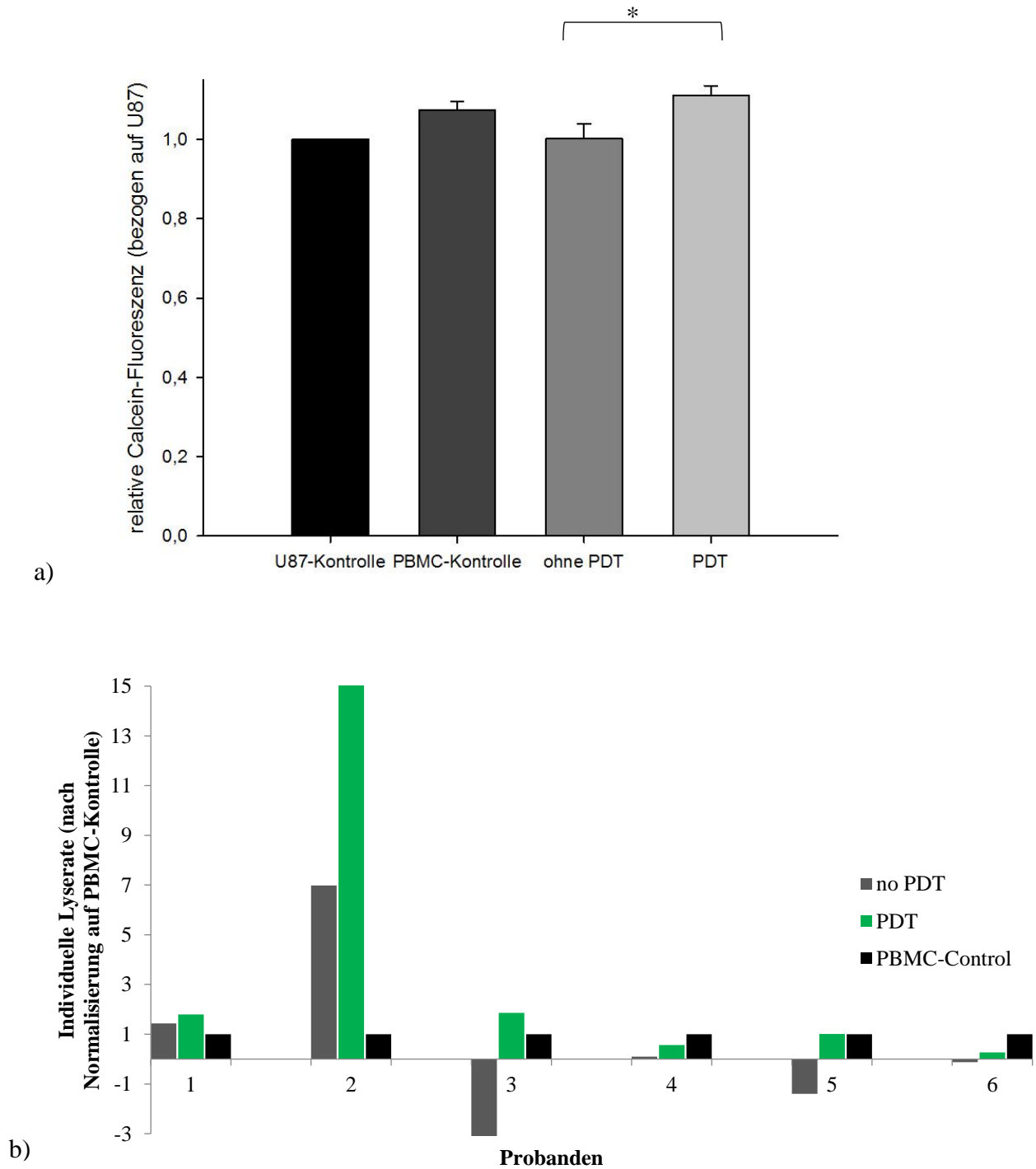
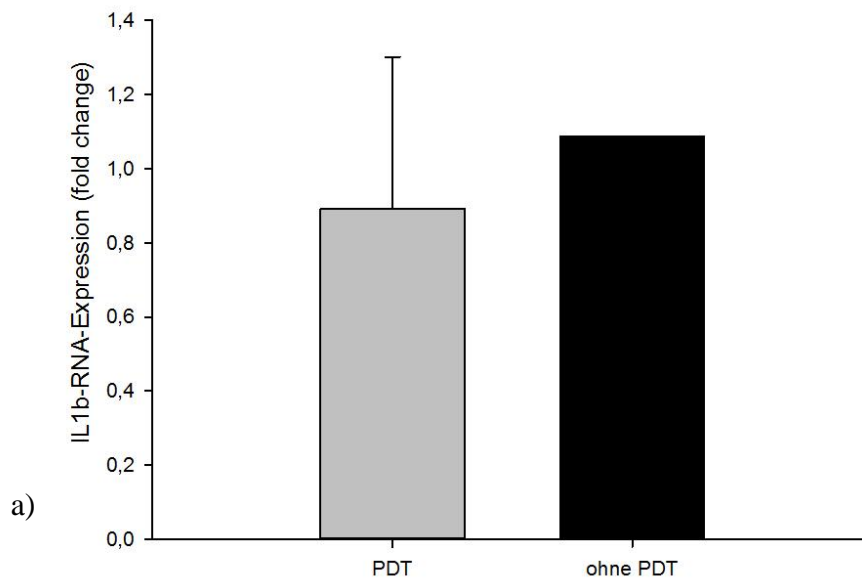


Abb. 26: Calcein-AM zum Nachweis der Lyseaktivität von PBMC bei erneutem Kontakt mit nativen U87-Zellen . Zuvor Sensibilisierung von PBMC durch 48 h Cokultur mit PDT-behandelten und unbehandelten U87. Die Lyseaktivität wird durch Messung der Calcein-Fluoreszenz bestimmt. a) Normalisierung auf die Fluoreszenz reiner U87 ohne Lyseaktivität (U87 Fluoreszenz =1). Anstieg der Calcein-Fluoreszenz und damit der Lyserate bei Sensibilisierung durch PDT-behandelte U87 (n=6, p=0,02). b) Zellyseaktivität der PBMC der einzelnen Probanden als Vielfaches der PBMC-Kontrolle nach Abzug der U87-Fluoreszenz.

5.2.6 DIE IL1B UND IL8-RNA-EXPRESSION SINKT NACH KONTAKT MIT PDT-BEHANDELTEN U87-ZELLEN

Neben zytotoxischen Zytokinen wurde in den CD8-Zellen nach Cokultur die IL1B- und IL8-RNA-Expression bestimmt. Hier kam es zu einem Abfall der relativen Expression beider Zytokine nach Cokultur von PDT-behandelten U87 mit PBMC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für IL1B konnte eine geringere Expression in der PDT-behandelten Cokultur gezeigt werden, jedoch ohne Signifikanzniveau zu erreichen (Mittelwert \pm SD = $0,89 \pm 0,41$; $p = 0,74$) (s. Abb. 27 a). Für IL8 konnte eine signifikant geringere Expression (Mittelwert \pm SD = $0,53 \pm 0,12$; $p = 0,0073$) (s. Abb. 27 b) gemessen werden.



Ergebnisse

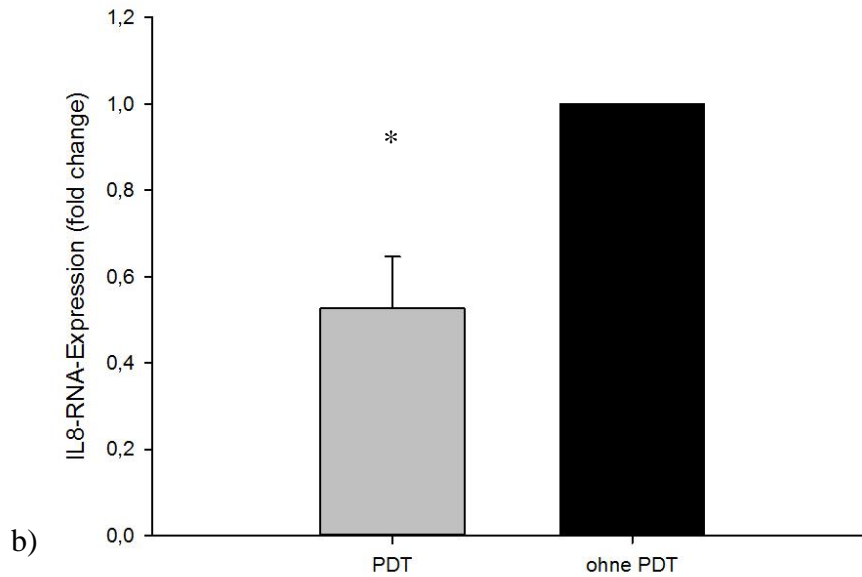


Abb. 27: Expression von IL1b und IL8 in CD8-positiven T-Zellen nach Isolation aus 48-stündiger direkter Cokultur von PBMC mit behandelten und unbehandelten U87-Zellen. Normalisierung auf Kontrollgruppe ohne PDT und Bildung von Mittelwerten. IL1b (a) n = 7. IL8 (b) n = 7; p = 0,0073.

5.2.7 PDT REDUZIERT DIE IMMUNPARALYTISCHE WIRKUNG VON U87 AUF T-ZELLEN

Eine durch das Glioblastom hervorgerufene Immunparalyse wurde in Experimenten mit PBMC untersucht. Anhand des Vergleichs von reinen PBMC mit Cokultur aus PBMC und U87 wurden Unterschiede analysiert. Bei direktem Kontakt in Cokultur mit unbehandelten U87 wurde die IFNG-RNA-Expression der CD8-T-Zellen signifikant auf 28% der reinen PBMC-Ansätze ohne U87-Kontakt verringert (Mittelwert \pm SD = $0,28 \pm 0,069$; $p = 2,29981 \times 10^{-5}$). Bei Betrachtung der CD8-Zellen nach Cokultur mit PDT-behandelten U87 zeigt sich ein Anstieg der IFNG-Expression gegenüber der Cokultur mit unbehandelten U87 auf 46% der PBMC-Kontrolle (Mittelwert \pm SD = $0,46 \pm 0,10$). Hierfür wurden die Werte der relativen Expression auf die der PBMC-Kontrolle ohne U87-Kontakt normalisiert (relative IFNG-Expression PBMC-Kontrolle = 1) (s. Abb. 28).

Ergebnisse

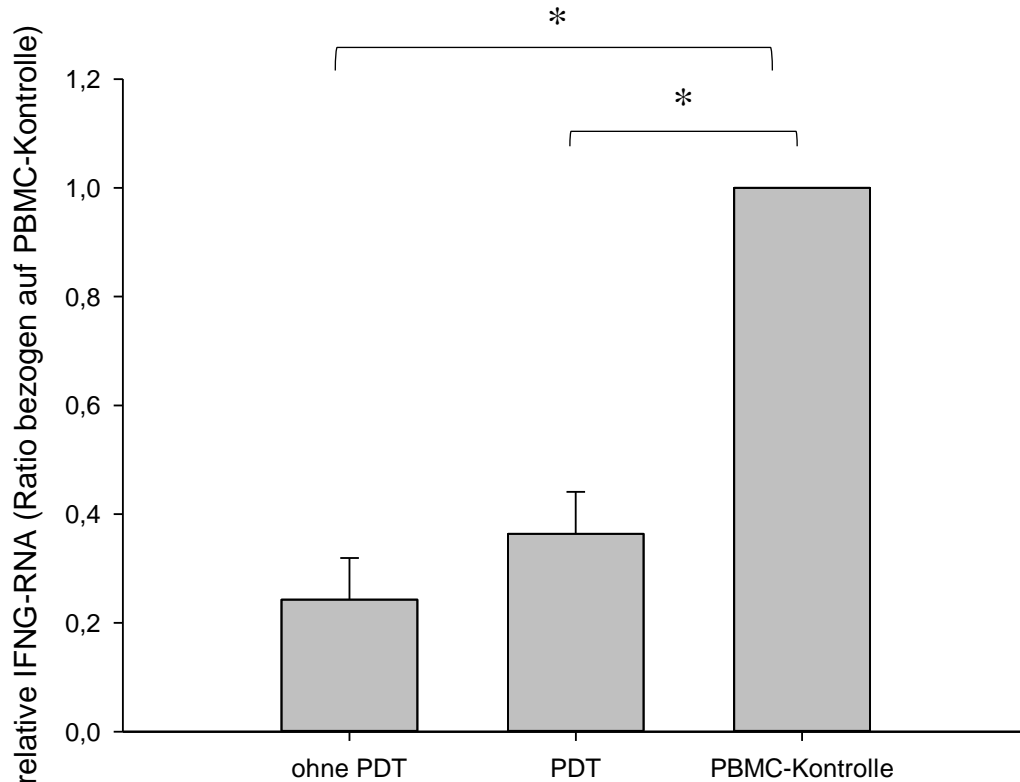


Abb. 28: Suppression der T-Zellen nach Direktkontakt mit U87. IFNG-Expression in CD8 Zellen nach 48-stündiger Kultur in Medium bzw. PBMC-Cokultur mit behandelten und nicht behandelten U87. Normalisierung auf Kontrolle= reine PBMC. (n=16, p (ohne PDT/Kontrolle) = 2,34945E-10; p (mit PDT/Kontrolle) = 1,91171E-06)

Dieses Ergebnis weist auf eine Abschwächung der Immunparalyse hin. Dieser Effekt der Aufhebung Tumorzellwirkung auf Immunzellen durch PDT und damit eine Minderung der Immunsuppression, konnte auch bei der Analyse der IL8 und IL1b-RNA-Expression in CD8-Zellen beobachtet werden. Bei sechs von sieben Probanden zeigte sich sowohl eine höhere IL1b-Expression als auch IL8-Expression bei Cokultur von unbehandelten U87 im Vergleich zur reinen PBMC-Kontrolle. Aus Cokulturen von PBMC mit PDT-behandelten U87-Zellen isolierte CD8 zeigen eine Rückentwicklung zum Ausgangswert der PBMC-Kontrolle. Es kommt bei sechs von sieben Probanden zum Absinken der IL1b- und IL8-Sekretion. Aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen sind die Ergebnisse der Probanden im Einzelnen aufgetragen (s. Abb. 29).

Ergebnisse

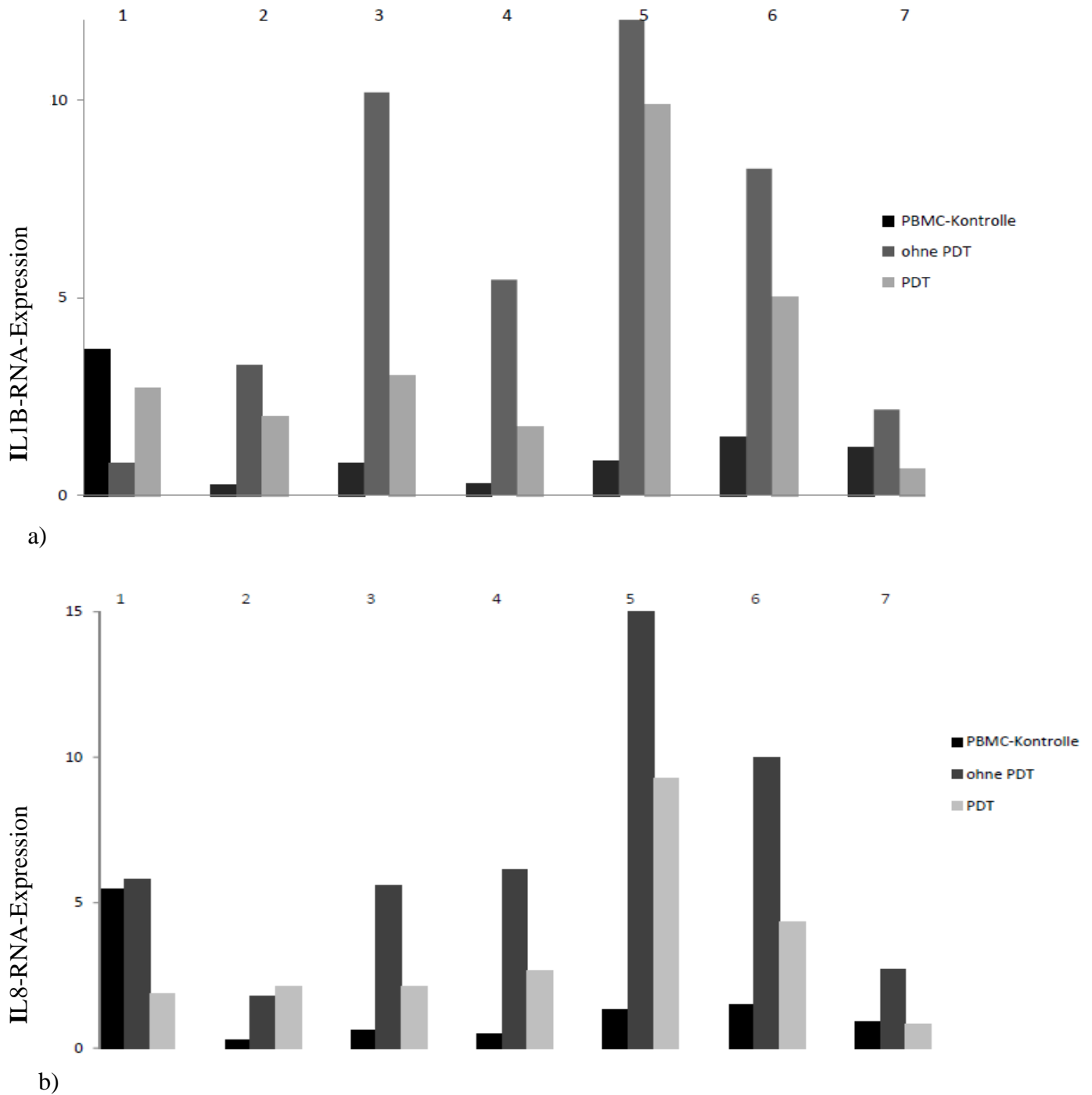


Abb. 29: Relative IL1B- (a) und IL8 (b)-RNA-Expression in CD8 Zellen einzelnen Probanden (Nr. 1-7), bei stark schwankenden interindividuellen Unterschieden. Bei 6 von 7 Probanden Absinken der IL1B-Expression nach Cokultur mit PDT-behandelten U87.

5.2.8 EXPRESSION DES T-ZELL SUPPRIMIERENDEN

OBERFLÄCHENMOLEKÜLS CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE-ASSOCIATED PROTEIN 4 (CTLA4)

Bei der Cokultur von Glioblastomzellen und PBMC kommt es zur Suppression der T-Zell-Aktivität, sodass eine immunogene Zerstörung der Tumorzellen unterdrückt wird. CTLA4 (CD152) ist ein Marker an der Oberfläche von T-Zellen, der bei Bindung an CD80 bzw. CD86 inhibitorische Wirkung auf T-Zellen ausübt. Um die Expression von CTLA4 zu überprüfen, wurde eine Cokultur aus PBMC und U87-Zellen (PDT-behandelt bzw. unbehandelte Kontrolle) im Verhältnis 10:1 angesetzt, anschließend wurde mit einem PE-konjugierten CTLA4-spezifischen Antikörper gefärbt und eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Nach Cokultur mit PDT-behandelten U87-Zellen konnte eine signifikant verminderte relative Expression von CTLA4 im Vergleich zur Cokultur mit unbehandelten U87-Zellen auf den T-Zellen detektiert werden (Normalisierung auf unbehandelte Kontrollen) von CTLA4 an der Oberfläche von T-Zellen detektiert werden. Dies galt sowohl für CD4 positive (Mittelwert \pm SD = $0,83 \pm 0,064$; $p=0,004$) als auch CD8 positive (Mittelwert \pm SD = $0,78 \pm 0,067$; $p=0,002$) T-Zellen (s. Abb. 30).

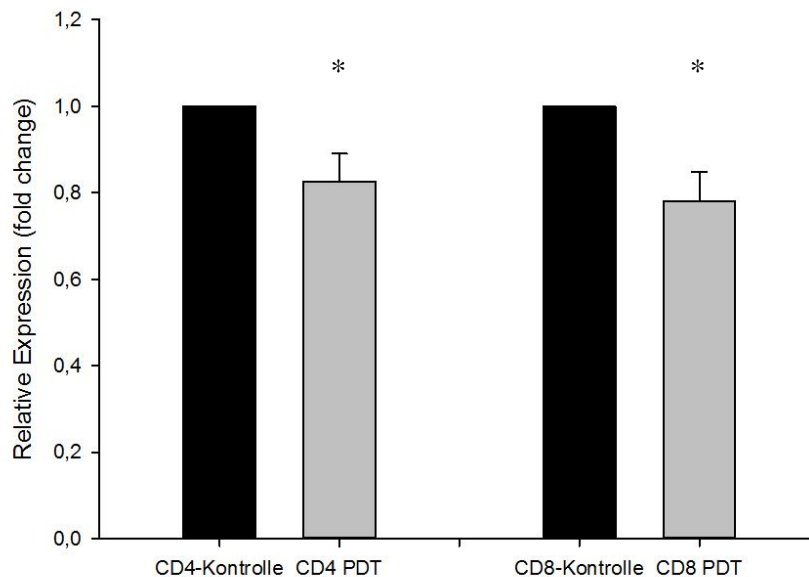


Abb. 30: CTLA4 an der Oberfläche von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Zur Normalisierung und Vergleichbarkeit wurde jeweils ein Quotient der T-Zellen nach Cokultur mit PDT-behandelten U87 und unbehandelten U87 gebildet. Kontrolle = 1. Es zeigt sich ein Rückgang des T-Zell-supprimierend wirkenden CTLA4 Moleküls. (n=5, CD4 $p=0,004$; CD8 $p=0,002$)

6 DISKUSSION

Die Behandlung eines Glioblastoms ist durch dessen aggressives und invasives Wachstum schwierig. Die Mortalität der Patienten ist sehr hoch, längerfristige posttherapeutische Tumorfreiheit wird meist nicht erreicht.

Die bisherige Standardtherapie besteht aus radikaler Resektion und einer nachfolgenden Radiochemotherapie⁷²⁻⁷⁴; das mittlere Überleben darunter liegt aktuell bei 15 Monaten⁴. Eine neue Therapieoption, welche derzeit in klinischen Studien evaluiert wird, ist die interstitielle photodynamische Therapie (iPDT). Diese besteht aus zwei Komponenten: einem oral applizierten Photosensibilisator und einer Bestrahlung des Gewebes mit Laserlicht. Vor Beginn der Narkoseeinleitung für die PDT nehmen die Patienten die Photosensibilisatorvorstufe 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA) per os zu sich. Nach einigen Stunden hat sich diese in den Tumorzellen angereichert und wird intrazellulär enzymatisch zu Protoporphyrin IX (PPIX) verstoffwechselt. Durch Einbringen von Lasersonden kann das Laserlicht im Tumorgewebe gezielt appliziert und damit durch die Anregung von PPIX die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eingeleitet werden. Die zellschädigende Wirkung der iPDT kann nur durch die Kombination von Photosensitizer-Applikation und Laserlicht auftreten⁴³.

Für die iPDT unter Verwendung von 5-ALA sind für die Patienten nur sehr geringe Nebenwirkungen beschrieben^{75 31}.

Bisher wurde in der Literatur die zelluläre Akutreaktion der PDT beschrieben: ROS-Generierung durch Aktivierung des Photosensibilisators mittels Laserlicht als initialen Reiz^{23,24,26-28}, Auslösen einer ausgeprägten Entzündungsreaktion, vaskuläre Schädigung^{72,76} und verschiedene Zelltodmechanismen^{23,72}.

Eine aktuelle Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe⁵⁷, bei der 15 Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom mit PDT behandelt wurden, zeigte wegweisende Ergebnisse: Es kam zu einem mittleren Überleben von 16 Monaten, wobei es bei einem Teil der Patienten zu Langzeitüberleben von über 30 Monaten bis hin zu 70 Monaten kam und das 2-Jahres-Überleben mit 55% signifikant höher als bei Resektion (36%) war. Beck et al. konnten bereits früher zeigen, dass Patienten mit Glioblastom-Rezidiv, welche mit photodynamischer Therapie behandelt worden waren, von der Therapie profitierten und ein Teil dieser Patienten eine längerfristiger Tumorkontrolle aufwies⁴¹. Bislang ist noch nicht untersucht, wie diese prolongierte Tumorkontrolle und das Erreichen einer anhaltenden Immunantwort erreicht werden. Es liegt nahe, dass das adaptive Immunsystem und Gedächtniszell-Bildung hierfür eine maßgebliche Rolle spielen⁷⁷. Es gibt erste Hinweise bei anderen Tumorarten, dass es nach PDT

zu einer erhöhten CD8-T-Zell-Infiltration kommt⁷⁸. Für PDT bei Glioblastomen existieren derzeit nur wenige Daten zu dieser Thematik.

Um diese Lücke zu schließen, widmete sich die vorliegende Arbeit der Untersuchung der Rolle der adaptiven Immunantwort bei der Anwendung von PDT bei Glioblastomen. Hierbei wurde der Fokus speziell auf die Untersuchung des Mechanismus der T-Zell-Antwort bei der in-vitro-PDT an einer Glioblastomzelllinie gelegt. Die Effekte wurden durch den Vergleich mit der unbehandelten Zelllinie als Kontrollgruppe herausgearbeitet.

Hierfür war es im ersten Schritt nötig, ein in-vitro-Modell zu entwickeln, welches der Situation bei interstitieller PDT an Glioblastom-Patienten nahekam. Diese Aufgabe gestaltete sich als besonders anspruchsvoll, da das Auslösen einer Immunantwort ein sehr komplexer Vorgang ist und bei Übertragung auf eine in-vitro-Situation eine Vielzahl an Komponenten berücksichtigt werden müssen. Zur Reduktion der variablen Faktoren im Modell wurden zunächst die Bedingungen für die in-vitro-PDT evaluiert, bevor zusätzlich Immunzellen in die Untersuchungen miteingeschlossen und nachfolgend analysiert wurden.

Diese beiden Arbeitsschritte sollen nun in den folgenden Kapiteln diskutiert werden:

- 1) Etablierung eines in-vitro-PDT-GBM-Modells
- 2) Etablierung eines in-vitro-PDT-GBM-Immunzellmodells und Analyse der T-Zell-Antwort

6.1 ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-PDT-GBM-MODELLS

Für die in-vitro-Versuche wurden Glioblastomzelllinie U87 unter Zugabe von 5-ALA in Medium inkubiert und im Anschluss mit Laserlicht der Wellenlänge 635 nm bestrahlt. Um die in-vivo-Situation auf eine in-vitro-Situation zu übertragen, mussten geeignete Bedingungen geschaffen werden. Welche Konzentration von 5-ALA gewählt werden sollte und mit welcher Bestrahlungsdosis gearbeitet werden sollte war zu Beginn der Arbeit noch unklar und musste ausgetestet werden. In den durchgeführten in-vitro-Versuchen konnte eine Schädigung der U87-Zellen durch alleinige Applikation des Photosensitizers bzw. durch alleinige Bestrahlung ausgeschlossen werden.

Die Schädigung der Tumorzellen in vivo ist abhängig von der Aufnahme von 5-ALA und dem PPIX-Stoffwechsel, dem PPIX-Bleichungs-Effekt⁷⁹, der Lage des Tumors und den versorgenden Gefäßen zu den Lasersonden sowie von der Bestrahlungsdosis.

Die Applikation von 20-30 mg/kg Körpergewicht 5-ALA beim Patienten erfolgt präoperativ peroral, sodass dieses bis zur Durchführung der PDT in den Tumorzellen angereichert ist. Für die in-vitro-Experimente wurde die Konzentration von 5-ALA anhand der PPIX-Fluoreszenz festgelegt. Diese wurde 4 h nach Applikation von 5-ALA in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Da auch bei Tumorzellen in vivo nicht von einer maximalen PPIX-Fluoreszenz und damit nicht von einer maximalen Aufsättigung aller Glioblastomzellen mit Photosensitizer ausgegangen werden kann, wurde eine PPIX-Konzentration mit 25 µg/ml gewählt, die damit einem im linear steigenden Fluoreszenzkurvenabschnitt gelegenen Wert entspricht.

Bei der in-vivo PDT werden die Lasersonden im 3D-Modell mit einem Optimalabstand von 9 mm geplant⁴¹; dadurch soll eine Schädigung des umliegenden Gewebes durch Hyperthermie einerseits und eine zu geringe Lichtdosis auf die dazwischengelegene Tumormasse andererseits verhindert werden. Die Bestimmung der Lichtdosen für das in-vitro-Modell wurde mittels Messung der Vitalität nach PDT erleichtert. Es konnte gezeigt werden, dass die zur Letalität führende Schädigung der Zellen mit der applizierten Lichtdosis korreliert und sich die Zellen mit zeitlichem Abstand zum Schädigungsereignis und abhängig vom Ausmaß der Schädigung regenerieren. Bei allen getesteten Lichtdosen war die Vitalität der Zellen durch Ablauf der Zelltodmechanismen nach 24 h am geringsten. Durchflusszytometrisch wurden für einzelne Lichtdosen Apoptoseanteil und Nekroseanteil gemessen, wobei der Anteil der nekrotischen Zellen bei der Höchstdosis von 5 J/cm² um ca. das Zehnfache anstieg, während die Apoptoserate relativ konstant blieb. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte durch unterschiedlich starke Zellschädigung und Auslösung verschiedener Zelltodmechanismen wurden drei Lichtdosen (1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm²) für die in-vitro-PDT festgelegt und somit die lageabhängigen Unterschiede der in-vitro-Situation imitiert.

Es wird beschrieben, dass durch die Applikation subletaler Bestrahlungsdosen häufig eine unspezifische Entzündungsreaktion durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Apoptose eingeleitet wird^{80 43 81 82}. Diese wird von einigen Autoren als mit beeinflussend für die immunogene Wirkung der PDT betrachtet^{78,83}. Bei der Apoptose kommt es im Unterschied zur Nekrose in einem schrittweise ablaufenden Prozess zur Chromatin-Kondensation und zur Fragmentierung der DNA durch Caspasen mit Zellschrumpfung. Dieser organisierte Ablauf wird als „programmierter Zelltod“ bezeichnet^{23,84}. Es wird jedoch auch beschrieben, dass die Entzündungsreaktion in Folge von Nekrosen ebenso eine adaptive Immunreaktion auslöst²³. Nekrose entsteht durch eine massive Zellschädigung von außen mit Zellschwellung und Membranschädigung. Sie ist im Gegensatz zur Apoptose nicht gerichtet⁸⁴. Im Versuchsaufbau dieser Arbeit konnten beide Mechanismen des Zelltods implementiert werden und damit eine maximale Nähe zur in-vivo-Situation gewährleistet werden.

6.2 ETABLIERUNG EINES IN-VITRO- PDT-GBM-IMMUNZELL-MODELLS

Zur Untersuchung der adaptiven Immunantwort wurden unterschiedliche Ansätze von T-Zell- bzw. PBMC-Kultur in PDT-GBM-Zell-Überstand bzw. in direktem Zellkontakt mit PDT behandelten und unbehandelten GBM-Zellen getestet. Dies war notwendig, da nicht bekannt war, welche Komponenten tatsächlich zum Auslösen einer adaptiven Immunantwort im in-vitro-Modell nötig sind. Diese Experimente basierten auf der Hypothese, dass die Aktivierung des adaptiven Immunsystems sowohl durch lösliche Faktoren, welche durch die Tumorzellen in die Umgebung sezerniert werden, als auch durch eine direkte Zell- Interaktion von Tumorzellen und PBMC zustande kommen kann.

Für die ersten Experimente wurden isolierte T-Zellen mit Tumorantigen in Form von U87-Zellkulturüberstand nach PDT bzw. ohne PDT inkubiert. Hierbei zeigte sich kein wesentlicher Effekt. Bei direktem Kontakt von T-Zellen mit PDT-behandelten U87 konnte ebenfalls kein Effekt bei anschließender Analyse der T-Zellen gesehen werden. Dagegen war die Kombination aus direktem Zell-Zell-Kontakt und Anwesenheit von PBMC mit antigenpräsentierenden Zellen wirksam hinsichtlich der Sekretion zytotoxischer Proteine. Die Relevanz antigenpräsentierender, dendritischer Zellen für die Entstehung einer Immunantwort ist in der Literatur mehrfach beschrieben^{72,82,85}. Etminan et al⁸⁶ konnten zeigen, dass es nach ALA/PDT zur Einwanderung von dendritischen Zellen in Tumorzellsphäroide kommt und eine erhöhte Antigenaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Ebenso wurde vor und während einer in-vivo-PDT (gezeigt u.a. am Mausmodell) die Einwanderung von Neutrophilen ins PDT-Gebiet und eine Neutrophilie im peripheren Blut beobachtet^{87 88 89}.

Da sich aus den Cokulturen von PBMC und PDT-behandelten bzw. unbehandelten U87 durchflusszytometrisch der Hinweis ergeben hatte, dass tendenziell eher eine Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen nach Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen stattfindet, wurden diese im Weiteren intensiv untersucht.

Die Zytotoxizität wurde auf RNA-Ebene durch Analyse der RNA-Expression von Lysemarkern in T-Zellen nach Cokultur mit PDT-behandelten U87 gemessen; die Funktionalität dieser zytotoxischen T-Zellen wurde auf Proteinebene anhand von Perforin-Elispot und Calcein-Zytotoxizitätsassay ermittelt. Die RNA-Expression von PRF zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlichen Anstieg. Ein anderer Zytotoxizitätsmarker, GZMB, zeigte auf RNA-Ebene hohe interindividuelle Schwankungen. Perforin wird zusammen mit Granzymen in Granula zytotoxisch wirkender Zellen gespeichert und nach Aktivierung freigesetzt⁹⁰.

Perforin löst eine Porenbildung in der Zellmembran der zu lysierenden Zelle aus durch welche Granzym in die Zielzelle gelangt ⁹¹⁻⁹³. Der Perforin-induzierte Zelltod wird somit durch Granzym vollzogen, jedoch gelangt Granzym ohne Perforin nicht an den Wirkort ^{90,94}. Insofern kann Perforin dafür als essentieller Schrittmacher betrachtet werden⁹⁵. Der Anstieg von Granzym B bei CD8 positiven Zellen, die aus der Cokultur mit unbehandelten U87 stammen, kann durch Gegenregulation aufgrund einer Perforin-Suppression mit reflektorischem Anstieg der Granzym-RNA-Expression erklärt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass qualitativer oder quantitativer Mangel an Perforin zu stärkerem Tumorwachstum und Verzögerung der Immunantwort führt ^{96 97 98}.

Mittels eines Perforin-Elispot-Assays konnte auch auf Proteinebene eine höhere Sekretion an Perforin bei erneutem Kontakt mit nativen U87-Zellen bei mit PDT-U87 vorstimulierten CD8-Zellen im Vergleich zu den CD8-Zellen gezeigt werden, die zuvor mit unbehandelten U87 vorstimuliert worden waren. Ebenso war die Lyse-Rate beim Calcein-Assay bei erneutem Kontakt von PDT-U87 vorstimulierten PBMC mit U87 höher als bei der Kontrollgruppe aus der Cokultur mit unbehandelten U87-Zellen. Somit konnte sowohl auf RNA-Ebene als auch im Rahmen von Funktionalitätsassays eine von CD8-Zellen ausgehende Zytotoxizität mit Sensibilisierung auf U87-Zellstrukturen nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass Glioblastome zur Suppression der Immunität, auch im peripheren Blut führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die stark immunsuppressive Wirkung der U87-Zellen unter anderem bei der Untersuchung von IFN γ nach Cokultur mit PBMC deutlich. Die IFN γ -Produktion wurde im Mittel auf weniger als ein Drittel des Ausgangswerts supprimiert. In der Literatur ist ein Absinken von IFN γ in der Umgebung von Gliomen beschrieben ⁹⁹. Das Wirkspektrum von IFN γ nach Bindung an IFN γ -Rezeptor ist sehr breit durch Modulation der Expression verschiedener Gene. Wichtig im Hinblick auf die antitumorigene Wirkung ist die Proinflammation mit u.a. der Aktivierung von Makrophagen sowie die Stimulierung der Bildung des Major Histocompatibility Complex (MHC) I und II ¹⁰⁰⁻¹⁰². Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser immunsuppressive Effekt durch die PDT abgemildert werden kann. Nach Kontakt von CD8-T-Zellen mit PDT-behandelten U87 konnte eine Erhöhung der IFNG- RNA-Expression gemessen werden. In-vivo könnte das beispielsweise zu einer Steigerung der Phagozytose-Rate führen ¹⁰³.

Zudem konnte eine verstärkte Inhibition von T-Zellen nach Kontakt mit U87-Zellen anhand durchflusszytometrischer Analysen ermittelt werden: Es zeigte sich eine deutlich verringerte Expression von CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) an der Oberfläche von CD8- und CD4- positiven T-Zellen nach deren Kontakt mit PDT-behandelten U87-Zellen im

Vergleich zu unbehandelten U87-Zellen. CTLA4 ist ein Protein an der Oberfläche von T-Zellen, das die Aktivität von T-Zellen inhibiert ¹⁰⁴ und kompetitiv mit CD28 an CD80 und CD86 bindet, wodurch eine negative Costimulation ausgelöst wird.¹⁰⁵ Eine Überexpression von CTLA4 bei Glioblastom-Patienten als einer der Escape-Mechanismen des Glioblastoms ist beschrieben ¹⁰⁶. Die verminderte CTLA4-Expression auf T-Zellen nach Cokultur mit PDT-behandelten U87, weist auf eine Verringerung der vom Glioblastom induzierten Immunparalyse hin ¹⁰⁵.

Der Effekt der PDT wird als ein Zusammenspiel vieler unterschiedlicher immunmodulatorischer Mechanismen gesehen. Deshalb wurden noch weitere Zytokin-RNA-Expressionen untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion der IL 8- und IL 1 β - Expression in CD8-positiven Zellen nach Cokultur mit PDT-behandelten U87 im Vergleich zur Cokultur mit unbehandelten U87. IL8 wird eine inflammatorische, aber auch proangiogenetische Wirkung durch Aktivierung des VEGF-Signalwegs zugeschrieben und sie wirken als Induktor der Metalloproteinasen (MMPs) ^{107,108}. Auch IL1 β wirkt proinflammatorisch, und proangiogenetisch durch Aktivierung eines autokrinen Signalloops, der den NF- κ B Signalweg hochreguliert und Invasion fördert ¹⁰⁸. Neben anderen Zytokinen wurde eine Erhöhung von IL8 in Serum-Proben von Glioblastom-Patienten beschrieben ¹⁰⁹. Durch die konsekutive Gefäßneubildung und damit an das Tumorwachstum angepasste Sauerstoffversorgung und das invasive Wachstum durch Stimulation von MMPs wird ein weiterer Tumorprogress induziert. Die Verminderung der IL8-RNA-Expression von T-Zellen als Konsequenz des Kontaktes mit PDT-behandelten U87-Zellen könnte also zur Verminderung des invasiven Wachstums und des allgemeinen Tumorwachstums führen.

7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Nach Behandlung von Glioblastomen mit photodynamischer Therapie kommt es bei manchen Patienten zu einem Langzeitüberleben. Es wird vermutet, dass diese Langzeitwirkung durch eine Gedächtniszellbildung der CD8-positiven Zellen zustande kommt¹¹⁰. Die Details und molekularbiologischen Hintergründe der Wirkung der photodynamischen Therapie bei Glioblastomen und ihres immunogenen Effekts sind bislang noch nicht geklärt.

Dieses Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines in-vitro-Modells näher untersucht und es konnte erstmals ein direkter Effekt einer PDT auf zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden.

Ob sich aus diesen Effektor-Zellen Memory-Zellen differenzieren, ist aktuell noch nicht untersucht. Es sind hierzu unterschiedliche Faktoren nötig, wie z.B. Antigenkontakt und die Sezernierung verschiedener Zytokine, wie z.B. IL15 und IL7^{111,112}. Dieser Mechanismus muss in weiteren Experimenten noch untersucht werden.

Im Tumorzell-Modell wurde der allogene Effekt, welcher durch die Cokultur der U87-Glioblastomzelllinie mit PBMC gesunder Spender zustande kam, nicht berücksichtigt. Dies und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse muss in zukünftigen Experimenten mit von Patienten gewonnenen primären Tumorzelllinien und autologen PBMCs evaluiert werden.

Insgesamt betrachtet, wird der Effekt der PDT durch ein Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren hervorgerufen. Für eine so aggressive und komplexe Tumorform wie das Glioblastom könnte diese Verteilung der Wirkung auf verschiedene Angriffspunkte ein sinnvoller und vielversprechender Ansatz sein.

Die Identifikation eines prädiktiven Markers, der das Ansprechen einzelner Patienten vom Nichtansprechen unterscheiden kann, wäre erstrebenswert. Dadurch könnte eine individuelle Optimaltherapie entwickelt werden und es wäre sogar denkbar durch präinterventionelle Modifikation des Immunsystems ein verbessertes Outcome zu erwirken.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastoma multiforme gehört zu den aggressivsten Tumoren überhaupt. Der Einsatz der perkutanen Bestrahlung mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie hat das mediane Überleben auf derzeit 15 Monate verbessert^{5,11,12}. Eine kurative Behandlung ist derzeit nicht möglich. Es besteht daher dringender Bedarf nach alternativen, effektiven Behandlungsmethoden.

Die interstitielle photodynamische Therapie stellt ein neues stereotaktisches, minimal invasives Verfahren zur Behandlung des Glioblastoms dar, das sich derzeit in der klinischen Erprobung befindet. Das Verfahren ermöglicht die millimetergenaue Bestrahlung eines Glioblastoms mit Licht über stereotaktisch implantierte Lasersonden nach vorausgegangener Photosensibilisierung des Tumors^{2,23,26}. In einer Pilotstudie der Neurochirurgischen Klinik der LMU wurde die photodynamischen Therapie erstmals als Initialbehandlung bei nicht komplett resektablen Glioblastomen durchgeführt. Adjuvant erfolgte bei allen Patienten eine Radiotherapie mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie. Überraschenderweise fand sich bei 40% der behandelten Patienten ein Langzeitüberleben (>60 Monate)⁵⁷. Induzierte anti-tumorigene immunologische Effekte werden zunehmend als wesentlicher Wirkmechanismus der photodynamischen Therapie diskutiert und erforscht²³. Die Aktivierung des innate Immunsystems kann hierbei nicht ohne weiteres langanhaltende anti-tumorigene Effekte der Bestrahlung erklären. Möglicherweise kommt es auch zu einer über photodynamische Effekte vermittelte Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Der Fokus der vorliegenden experimentellen Arbeit lag auf der Analyse der T-Zell Antwort nach photodynamischer Therapie. In einem in-vitro-Modell, das der klinischen in vivo Situation möglichst angenähert war, wurden Tumorzellen (Glioblastomzelllinie U87) für 4 Stunden mit 25 µg/ml 5-Aminolaevulinsäure (Vorläufer des Photosensibilators Protoporphyrin IX) inkubiert und mit drei verschiedenen Lichtdosen (1,3,5 J/cm²) bestrahlt. Zellen aus der bestrahlten und der Kontrollgruppe wurden anschließend mit PBMC gesunder Probanden kokultiviert. Anschließend wurden CD8-positive Zellen separiert.

Die Analyse der mRNA-Expression CD8-positiver Zellen mittels qRT-PCR ergab einen signifikanten Anstieg von Perforin und Interferon γ in der bestrahlten Gruppe. Separierte CD8-positive Zellen aus der bestrahlten Gruppe zeigten eine signifikant erhöhte Lyseaktivität nach Kokultivierung mit unbehandelten U87-Zellen. Desweiteren fand sich nach Bestrahlung eine signifikant verminderte CTLA4-Expression an der T-Zelloberfläche bei Kokultur mit

Zusammenfassung

photodynamisch behandelten U87 Zellen als Ausdruck einer Abnahme der tumorassoziierten Immunparalyse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen Mechanismen auf, welche langanhaltende antineoplastische Effekte der photodynamischen Bestrahlung erklären könnten. Das beschriebene Zellkulturmodell könnte zukünftig als Screeningverfahren eingesetzt werden, um das individuelle Ansprechen des Patienten auf eine photodynamische Bestrahlung im Vorfeld einzuschätzen und die Selektionskriterien für diese Behandlung zu verbessern.

9 SUMMARY

Glioblastoma multiforme is one of the most aggressive tumors. The use of external beam radiation in combination with concomitant and adjuvant chemotherapy has improved median survival to currently 15 months^{5,11,14}. However, no curative treatment exists so far. There is an urgent need for alternative, more effective treatment options.

Interstitial photodynamic therapy represents a new stereotactic, minimally invasive procedure for the treatment of glioblastoma currently being under clinical and experimental evaluation. The procedure enables accurate irradiation of a glioblastoma via stereotactically implanted laser probes after prior photosensitization of the tumor^{2,23,26}. In a pilot study conducted by the Neurosurgical Clinic of the LMU, photodynamic therapy was carried out for the first time as an initial treatment for non-resectable glioblastomas. All patients additionally underwent radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy. Surprisingly, 40% of the treated patients experienced long-term survival (>60 months)⁵⁷. Induced anti-tumor immunological effects are increasingly being discussed and researched as an essential mechanism of action in photodynamic therapy²³. The activation of the innate immune system, however, cannot sufficiently explain long-lasting anti-tumour effects of photodynamic treatment. We here speculated on a photodynamic treatment induced activation of the adaptive immune system.

The current experimental work has focused on the T-cell response after photodynamic therapy. In an in vitro model, which was as close as possible to the clinical in vivo situation, tumor cells (glioblastoma cell line U87) were incubated for 4 hours with 25 µg/ml 5-aminolaevulin acid (a precursor of the photosensitizer protoporphyrin IX) and subsequently irradiated with three different light doses (1,3,5 J/cm²). Cells from the irradiated and control group were then co-cultured with PBMC of healthy volunteers. Afterwards, CD8-positive cells were separated.

Analysis of the mRNA expression of CD8-positive cells using qRT-PCR showed a significant increase of Perforin and Interferon γ in the irradiated group. Separated CD8-positive cells from the irradiated group showed a significantly increased lysis activity after co-cultivation with untreated U87 cells. Furthermore, after irradiation, a significantly decreased CTLA4 expression on the T cell surface was found after co-culture with photodynamically treated U87 cells indicating a decrease of tumor-associated immune paralysis.

The results of this work uncover mechanisms that might explain long-lasting antineoplastic effects of photodynamic irradiation of glioblastoma cell lines. The described cell culture model might be further developed towards a screening method to assess the individual response to

Summary

photodynamic irradiation thereby improving selection criteria for interstitial photodynamic treatment.

10 ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|--------------------------------------|
| 5-ALA | 5- Aminolaevulinsäure |
| AP-1 | Activator protein 1 |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Calcein-AM | Calcein-Acetoxymethylester |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CTB | Cell titer blue Assay |
| DAMP | Damage-associated molecular patterns |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FACS | Flourescence- activated Cell Sorting |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | Forward scatter |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| HSA | Humanes Serumalbumin |

Anhang

| | |
|----------|---|
| HSP | Hitze-Schock-Proteinen |
| IFNgamma | Interferon gamma |
| IL | Interleukin |
| MACS | Magnetic activated cell sorting |
| MEM | Minimum essential Medium |
| MGMT | O6-Methylguanin-Metyhl-Transferase |
| MHC | Major histocompatibility complex class |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid |
| NF-Kb | Nuclear-factor Kappa b |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells, Periphere mononukleäre Blutzellen |
| PBS | Phosphate bufferd saline |
| PDT | Photodynamische Therapie |
| PI | Propidium iodide |
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| p-Wert | Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert |
| qRT PCR | Quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SSC | Side scatter |
| TGFbeta | Tranforming growth factor beta |

Anhang

| | |
|----------|----------------------------|
| TH | T-Helferzellen |
| TNFalpha | Tumor-Nekrose-Faktor alpha |
| WHO | World Health Organization |

10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abb. 1 Übersicht über den physikalischen Mechanismus der PDT ²³ . | 11 |
| Abb. 2: Absorptionsspektrum von PPIX ³⁴ | 13 |
| Abb. 3: Zytolytische Mechanismen der CD8 ⁵⁰ . | 16 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung 96-Well Platte zur Bestrahlung in der Bestrahlungskammer. | 28 |
| Abb. 5: Bestrahlungskammer mit Laser für in-vitro PDT | 28 |
| Abb. 6: Dichtegradientenzentrifugation zur Separierung von PBMC aus Vollblut ⁵⁸ . | 30 |
| Abb. 7: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation: ⁵⁹ | 31 |
| Abb. 8: Schematische Darstellung des direkten oder indirekten Labelings..... | 31 |
| Abb. 9: Übersicht über die Gating-Strategie | 34 |
| Abb. 10: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese | 36 |
| Abb. 11: Schematische Darstellung zum Ablauf der quantitativen real time PCR ⁶⁴ | 37 |
| Abb. 12: Schematische Darstellung zum Elispot. ¹ | 39 |
| Abb. 13: Schematische Darstellung des Calcein AM Assays. ⁶⁸ | 40 |
| Abb. 14: PPIX-Fluoreszenz: Fluoreszenzmessung nach 4 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-ALA | 42 |
| Abb. 15: Vitalität 4 h nach PDT mit unterschiedlichen Lichtdosen | 43 |
| Abb. 16; Vitalität 24 h nach PDT mit unterschiedlichen Lichtdosen | 43 |
| Abb. 17: Zeitkinetik über die Vitalität der U87 nach PDT | 44 |
| Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse der Zelltod-Mechanismen. | 45 |
| Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsmarker von T-Zellen. | 47 |
| Abb. 20: Genexpression von IL2, IFNG, GZMB und PRF in PanT-Zellen nach Cokultur von U87 und PBMC (Ausführung in Duplikaten) | 49 |
| Abb. 21: Schematische Darstellung des In-vitro-Modells zur Analyse der T-Zellantwort nach Kontakt mit PDT-behandelten Glioblastomzellen | 50 |
| Abb. 22: PFR-Expression CD8-positiver T-Zellen. Nach 48 h-Cokultur..... | 51 |
| Abb. 23: IFNg-Expression aus CD8 positiven T-Zellen. Nach 48 h-Cokultur..... | 51 |
| Abb. 24: GZMB-Expression aus CD8 positiven T-Zellen. Nach 48h-Cokultur..... | 52 |
| Abb. 25: Perforin-Elispot mit U87 als Restimulus | 53 |
| Abb. 26: Calcein-AM zum Nachweis der Lyseaktivität von PBMC bei erneutem Kontakt mit nativen U87-Zellen..... | 54 |
| Abb. 27: Expression von IL1b und IL8 in CD8-positiven T-Zellen | 56 |
| Abb. 28: Suppression der T-Zellen nach Direktkontakt mit U87 | 57 |
| Abb. 29: Relative IL1B- (a) und IL8 (b)-RNA-Expression in CD8 Zellen | 58 |

Anhang

| | |
|---|----|
| Abb. 30: CTLA4 an der Oberfläche von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. | 59 |
|---|----|

10.3 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 <http://www.immunospot.com/resources/protocols/ELISPOT-protocol.htm>, 2017).
- 2 Brown, S. B., Brown, E. A. & Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet. Oncology* **5**, 497-508, doi:10.1016/s1470-2045(04)01529-3 (2004).
- 3 Paulus, W. & Hasselblatt, M. in *Pathologie* (eds Günter Klöppel *et al.*) Ch. 18, 481-549 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
- 4 Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F. & Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet (London, England)* **361**, 323-331, doi:10.1016/s0140-6736(03)12328-8 (2003).
- 5 Noroxe, D. S., Poulsen, H. S. & Lassen, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO open* **1**, e000144, doi:10.1136/esmoopen-2016-000144 (2016).
- 6 Crane, C. A., Ahn, B. J., Han, S. J. & Parsa, A. T. Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Neuro-oncology* **14**, 584-595, doi:10.1093/neuonc/nos014 (2012).
- 7 Schlegel, U. in *Klinische Neurologie* (ed Peter Berlit) Ch. 32, 687-721 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
- 8 Sasmita, A. O., Wong, Y. P. & Ling, A. P. K. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, doi:10.1111/ajco.12756 (2017).
- 9 Han, C. H. & Batchelor, T. T. Isocitrate dehydrogenase mutation as a therapeutic target in gliomas. *Chinese Clinical Oncology* **6** (2017).
- 10 Bush, N. A. & Butowski, N. The Effect of Molecular Diagnostics on the Treatment of Glioma. *Current oncology reports* **19**, 26, doi:10.1007/s11912-017-0585-6 (2017).
- 11 Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**, 997-1003, doi:10.1056/NEJMoa043331 (2005).
- 12 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).

- 13 Hart, M. G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K. & Grant, R. Temozolomide for high grade glioma. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd007415, doi:10.1002/14651858.CD007415.pub2 (2013).
- 14 Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J. C. & Pentheroudakis, G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **25 Suppl 3**, iii93-101, doi:10.1093/annonc/mdu050 (2014).
- 15 Roa, W. *et al.* Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 1583-1588, doi:10.1200/jco.2004.06.082 (2004).
- 16 Weller, M. *et al.* Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-oncology* **14 Suppl 4**, iv100-108, doi:10.1093/neuonc/nos206 (2012).
- 17 Leroy, H. A., Vermandel, M., Lejeune, J. P., Mordon, S. & Reyns, N. Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. *Lasers in surgery and medicine* **47**, 441-451, doi:10.1002/lsm.22359 (2015).
- 18 Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 699-708, doi:10.1056/NEJMoa1308573 (2014).
- 19 Quirk, B. J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand? *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.04.009.
- 20 Wainwright, D. A. *et al.* Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4 and PD-L1 in mice with brain tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-0514 (2014).
- 21 Wang, Y. & Jiang, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer letters* **331**, 139-146, doi:10.1016/j.canlet.2012.12.024 (2013).
- 22 Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005 (2015).
- 23 Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 250-281, doi:10.3322/caac.20114 (2011).

- 24 Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 380-387 (2003).
- 25 Allison, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Future Oncology* **10**, 123-124, doi:10.2217/fon.13.176 (2013).
- 26 Allison, R. R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **1**, 27-42, doi:10.1016/s1572-1000(04)00007-9 (2004).
- 27 Pizova, K. *et al.* Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **156**, 93-102, doi:10.5507/bp.2012.056 (2012).
- 28 Nowis, D. *et al.* Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta biochimica Polonica* **52**, 339-352 (2005).
- 29 Inguscio, V., Panzarini, E. & Dini, L. Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy. *Cells* **1**, 464-491, doi:10.3390/cells1030464 (2012).
- 30 Stummer, W. *et al.* Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *Journal of neuro-oncology* **87**, 103-109, doi:10.1007/s11060-007-9497-x (2008).
- 31 Webber, J., Kessel, D. & Fromm, D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *The Journal of surgical research* **68**, 31-37, doi:10.1006/jsre.1997.5004 (1997).
- 32 Kelty, C. J., Brown, N. J., Reed, M. W. & Ackroyd, R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **1**, 158-168 (2002).
- 33 Anand, S., Ortel, B. J., Pereira, S. P., Hasan, T. & Maytin, E. V. Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer letters* **326**, 8-16, doi:10.1016/j.canlet.2012.07.026 (2012).
- 34 Quintanar, L., Stolik, S. & de la Rosa, J. *Development of an irradiation system for Photodynamic Therapy with dosimetric.* (2015).
- 35 Szeimies, R. M. *et al.* Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *The British journal of dermatology* **163**, 386-394, doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09873.x (2010).

- 36 Hillemanns, P. *et al.* A randomized study of hexaminolevulinate photodynamic therapy in patients with cervical intraepithelial neoplasia 1/2. *American journal of obstetrics and gynecology* **212**, 465.e461-467, doi:10.1016/j.ajog.2014.10.1107 (2015).
- 37 Gossner, L. *et al.* Photodynamic destruction of high grade dysplasia and early carcinoma of the esophagus after the oral administration of 5-aminolevulinic acid. *Cancer* **86**, 1921-1928 (1999).
- 38 Hungerhuber, E. *et al.* Seven years' experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* **69**, 260-264, doi:10.1016/j.urology.2006.10.015 (2007).
- 39 Zaak, D. *et al.* Ultraviolet-excited (308 nm) autofluorescence for bladder cancer detection. *Urology* **60**, 1029-1033 (2002).
- 40 Bader, M. J. *et al.* Photodynamic therapy of bladder cancer - a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urologic oncology* **31**, 1178-1183, doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.007 (2013).
- 41 Beck, T. J. *et al.* Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers in surgery and medicine* **39**, 386-393, doi:10.1002/lsm.20507 (2007).
- 42 Christoph Schwartz, H. S., Adrian Rühm, Jörg-Christian Tonn, Simone Kreth, Friedrich-Wilhelm Kreth. Interstitial photodynamic therapy for de-novo glioblastoma multiforme WHO IV: a feasibility study *Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). Karlsruhe* (2015).
- 43 Kammerer, R. *et al.* Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PloS one* **6**, e21834, doi:10.1371/journal.pone.0021834 (2011).
- 44 Gollnick, S. O. & Brackett, C. M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunologic research* **46**, 216-226, doi:10.1007/s12026-009-8119-4 (2010).
- 45 Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Immunogenic cell death: can it be exploited in PhotoDynamic Therapy for cancer? *BioMed research international* **2013**, 482160, doi:10.1155/2013/482160 (2013).
- 46 Martin, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends in molecular medicine* **18**, 742-749, doi:10.1016/j.molmed.2012.09.007 (2012).

- 47 Weller, M. & Fontana, A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain research. Brain research reviews* **21**, 128-151 (1995).
- 48 Kaminska, B., Kocyk, M. & Kijewska, M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* **986**, 171-187, doi:10.1007/978-94-007-4719-7_9 (2013).
- 49 Kaufmann, S. E. in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Springer-Lehrbuch* (eds Helmut Hahn, Stefan H. E. Kaufmann, Thomas F. Schulz, & Sebastian Suerbaum) Ch. 13, 76-90 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
- 50 Kaufmann, S. H. E. in *Basiswissen Immunologie Springer-Lehrbuch* Ch. 8, 63-83 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
- 51 Walker, P. R., Calzascia, T. & Dietrich, P. Y. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology* **107**, 28-38 (2002).
- 52 Nduom, E. K., Weller, M. & Heimberger, A. B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro-oncology* **17 Suppl 7**, vii9-vii14, doi:10.1093/neuonc/nov151 (2015).
- 53 Chae, M. *et al.* Increasing glioma-associated monocytes leads to increased intratumoral and systemic myeloid-derived suppressor cells in a murine model. *Neuro-oncology* **17**, 978-991, doi:10.1093/neuonc/nou343 (2015).
- 54 Corkum, C. P. *et al.* Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunology* **16**, 48, doi:10.1186/s12865-015-0113-0 (2015).
- 55 Han, S. *et al.* Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *British journal of cancer* **110**, 2560-2568, doi:10.1038/bjc.2014.162 (2014).
- 56 Morford, L. A., Dix, A. R., Brooks, W. H. & Roszman, T. L. Apoptotic elimination of peripheral T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. *Journal of neurosurgery* **91**, 935-946, doi:10.3171/jns.1999.91.6.0935 (1999).
- 57 Schwartz, C. *et al.* Interstitial photodynamic therapy for de-novo glioblastoma multiforme WHO IV: a feasibility study *Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). Karlsruhe, 07.-10.06.2015. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015.* (2015).
- 58 Naumann, L. *Untersuchungen zum differenzierten Wirkungsprofil von Glucocorticoiden in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes* (2005).

- 59 Miltenyi Biotec. *MACS® MicroBeads - the most trusted and proven*, <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads_dp.aspx> (2016).
- 60 Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1776**, 86-107, doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.001 (2007).
- 61 Ambion. *RNAqueous® Kit, Protocol*, <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1912>> (2008).
- 62 Roche Diagnostics GmbH. *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis, Instructions for Use Kit Version 06*, <https://lifescience.roche.com/shop/Instructions4Use?storeId=15006&catalogId=10001&langId=-1&id=iforu&iforu_page=search&catalogNumber=REF+04379012001&instruction_version=Version+06> (2010).
- 63 Roche Diagnostics GmbH. <<https://lifescience.roche.com/shop/home>> (2016).
- 64 <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>, (2017).
- 65 Mabtech. *Product datasheet for HumanPerforin EliSpot Plus*, <<https://www.mabtech.com/products/3465-4apw-human-perforin-elispotplus-alp>> (2014).
- 66 Tang, J., Flomenberg, P., Harshyne, L., Kenyon, L. & Andrews, D. W. Glioblastoma patients exhibit circulating tumor-specific CD8+ T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 5292-5299, doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-0545 (2005).
- 67 Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L. & Facchini, A. Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**, 1131-1135, doi:10.1128/cdli.8.6.1131-1135.2001 (2001).
- 68 <https://bio530.wikispaces.com/Calcein+AM>, (2017).
- 69 Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H. & Williams, K. C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**, 410-419, doi:10.1002/cyto.a.20859 (2010).
- 70 Jing, Y. *et al.* Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human

- peripheral blood. *Experimental gerontology* **42**, 719-732, doi:10.1016/j.exger.2007.01.009 (2007).
- 71 Lim, J. Y., Gerber, S. A., Murphy, S. P. & Lord, E. M. Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **63**, 259-271, doi:10.1007/s00262-013-1506-7 (2014).
- 72 Anzengruber, F., Avci, P., de Freitas, L. F. & Hamblin, M. R. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: why does it not always work and how can we improve it? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **14**, 1492-1509, doi:10.1039/c4pp00455h (2015).
- 73 Manda, K., Glasow, A., Paape, D. & Hildebrandt, G. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. *Frontiers in oncology* **2**, 102, doi:10.3389/fonc.2012.00102 (2012).
- 74 Anton, D., Dabadghao, S., Palucka, K., Holm, G. & Yi, Q. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scandinavian journal of immunology* **47**, 116-121 (1998).
- 75 Quirk, B. J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **12**, 530-544, doi:10.1016/j.pdpdt.2015.04.009 (2015).
- 76 Canti, G. *et al.* Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anti-cancer drugs* **5**, 443-447 (1994).
- 77 Korbelik, M., Krosi, G., Krosi, J. & Dougherty, G. J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer research* **56**, 5647-5652 (1996).
- 78 Korbelik, M., Stott, B. & Sun, J. Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression. *British journal of cancer* **97**, 1381-1387, doi:10.1038/sj.bjc.6604059 (2007).
- 79 Hennig, G., Stepp, H. & Johansson, A. Photobleaching-based method to individualize irradiation time during interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **8**, 275-281, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.338 (2011).
- 80 Korbelik, M., Sun, J. & Cecic, I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. *Cancer research* **65**, 1018-1026 (2005).

- 81 Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R. & Heger, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer metastasis reviews* **34**, 643-690, doi:10.1007/s10555-015-9588-7 (2015).
- 82 Wachowska, M., Muchowicz, A. & Demkow, U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Central-European journal of immunology / Polish Society for Immunology and eleven other Central-European immunological societies* **40**, 481-485, doi:10.5114/ceji.2015.56974 (2015).
- 83 Lilge, L., Portnoy, M. & Wilson, B. C. Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. *British journal of cancer* **83**, 1110-1117, doi:10.1054/bjoc.2000.1426 (2000).
- 84 Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* **146**, 3-15 (1995).
- 85 Wang, X. *et al.* Stimulation of dendritic cells by DAMPs in ALA-PDT treated SCC tumor cells. *Oncotarget* **6**, 44688-44702, doi:10.18632/oncotarget.5975 (2015).
- 86 Etminan, N. *et al.* Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. *British journal of cancer* **105**, 961-969, doi:10.1038/bjc.2011.327 (2011).
- 87 Castano, A. P., Mroz, P. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**, 535-545, doi:10.1038/nrc1894 (2006).
- 88 Cecic, I. & Korblick, M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer letters* **183**, 43-51 (2002).
- 89 Kushibiki, T., Tajiri, T., Tomioka, Y. & Awazu, K. Photodynamic therapy induces interleukin secretion from dendritic cells. *International journal of clinical and experimental medicine* **3**, 110-114 (2010).
- 90 Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology* **15**, 388-400, doi:10.1038/nri3839 (2015).
- 91 Skals, M. & Praetorius, H. A. Mechanisms of cytolysin-induced cell damage -- a role for auto- and paracrine signalling. *Acta physiologica (Oxford, England)* **209**, 95-113, doi:10.1111/apha.12156 (2013).

- 92 Thiery, J. *et al.* Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature immunology* **12**, 770-777, doi:10.1038/ni.2050 (2011).
- 93 Brennan, A. J., Chia, J., Trapani, J. A. & Voskoboinik, I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell death and differentiation* **17**, 607-615, doi:10.1038/cdd.2009.212 (2010).
- 94 Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M. & Trapani, J. A. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* **18**, 319-329 (2003).
- 95 Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology* **2**, 735-747, doi:10.1038/nri911 (2002).
- 96 Chia, J. *et al.* Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9809-9814, doi:10.1073/pnas.0903815106 (2009).
- 97 van den Broek, M. E. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1781-1790 (1996).
- 98 Smolders, J. *et al.* Characteristics of differentiated CD8(+) and CD4 (+) T cells present in the human brain. *Acta neuropathologica* **126**, 525-535, doi:10.1007/s00401-013-1155-0 (2013).
- 99 Kane, A. & Yang, I. Interferon-gamma in brain tumor immunotherapy. *Neurosurgery clinics of North America* **21**, 77-86, doi:10.1016/j.nec.2009.08.011 (2010).
- 100 Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B. & Nandi, D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* **50**, 1-14, doi:10.1016/j.cyto.2009.11.021 (2010).
- 101 Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* **15**, 749-795, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749 (1997).
- 102 de Araujo-Souza, P. S., Hanschke, S. C. & Viola, J. P. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. *Journal of immunology research* **2015**, 849573, doi:10.1155/2015/849573 (2015).
- 103 Badovinac, V. P., Tvinnereim, A. R. & Harty, J. T. Regulation of Antigen-Specific CD8+ T Cell Homeostasis by Perforin and Interferon- γ . *Science* **290**, 1354-1357, doi:10.1126/science.290.5495.1354 (2000).

- 104 Castro, M. G., Baker, G. J. & Lowenstein, P. R. Blocking immunosuppressive checkpoints for glioma therapy: the more the Merrier! *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 5147-5149, doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-0820 (2014).
- 105 Wolchok, J. D. & Saenger, Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *The oncologist* **13 Suppl 4**, 2-9, doi:10.1634/theoncologist.13-S4-2 (2008).
- 106 Kmiecik, J. *et al.* Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *Journal of neuroimmunology* **264**, 71-83, doi:10.1016/j.jneuroim.2013.08.013 (2013).
- 107 Zarogoulidis, P. *et al.* Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Cancer investigation* **32**, 197-205, doi:10.3109/07357907.2014.898156 (2014).
- 108 Voronov, E. *et al.* IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2645-2650, doi:10.1073/pnas.0437939100 (2003).
- 109 Albulescu, R. *et al.* Cytokine Patterns in Brain Tumour Progression. *Mediators of Inflammation* **2013**, 979748, doi:10.1155/2013/979748 (2013).
- 110 Slifka, M. K. & Whitton, J. L. Activated and memory CD8+ T cells can be distinguished by their cytokine profiles and phenotypic markers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 208-216 (2000).
- 111 Joshi, N. S. & Kaech, S. M. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 1309-1315 (2008).
- 112 Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature reviews. Immunology* **12**, 749-761, doi:10.1038/nri3307 (2012).

10.4 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Gabriele Strauß, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der T-Zell-Antwort nach photodynamischer Therapie von
Glioblastomen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Gabriele Strauß

München, 04.07.2018

10.5 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, welche mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und die Zeit fachlich und menschlich bereichert haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Simone Kreth für ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung, während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Viele lehrreiche und spannende Gespräche und ihr wissenschaftlicher Weitblick konnten mich stets motivieren und für die Forschung begeistern.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe möchte ich für die geduldige Hilfestellung bei technischen oder fachlichen Fragestellungen danken. Die familiäre Atmosphäre machte das Arbeiten stets zur Freude. Insbesondere danke ich Max Hübner und David Effinger für viele intensive Gespräche und Diskussionen, Ratschläge und Anmerkungen, die mir auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte aufzeigten. Auch viele nicht-wissenschaftliche und ermutigende Gespräche haben meine Arbeit unterstützt.

Sehr großer Dank gebührt auch den Kollegen des LIFE-Zentrums für die fachliche und technische Unterstützung, intensive Diskussionen und die umfassende freundschaftliche Hilfestellung bei jeglichen Problemen. Speziell beim Laserforschungslabor möchte ich mich für die großzügige Bereitstellung der Bestrahlungskammer und des in vitro PDT-Lasers und der damit verbundene Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Heike Pohla für ihr stets offenes Ohr, zahlreiche und unermüdliche fachliche Gespräche, die mich durch ihre umfassenden Kenntnisse immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen und die Entstehung dieser Arbeit wesentlich mitgeprägt haben.

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinem Lebensgefährten Ulrich, bedanken. Sie haben mich auf diesem Weg immer geduldig und vertrauensvoll begleitet, mich stets bestärkt und waren mir bei der Erstellung dieser Arbeit immer eine außerordentliche Stütze.